



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JESSICA SILVA DE ALMEIDA MORAIS

NOVAS FUNCIONALIZAÇÕES NA FIBRA DA CASCA DE COCO VERDE
VISANDO UM SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

FORTALEZA

2020

JESSICA SILVA DE ALMEIDA MORAIS

NOVAS FUNCIONALIZAÇÕES NA FIBRA DA CASCA DE COCO VERDE VISANDO
UM SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.

Coorientadora: Dra. Ana Iraidy Santa Brígida.

FORTALEZA

2020

Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M825n Morais, Jessica Silva de Almeida.

Novas funcionalizações na fibra da casca de coco verde visando um suporte para
imobilização enzimática / Jessica Silva de Almeida Moraes. – 2020.

75 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.

Coorientação: Prof. Dr. Ana Iraidy Santa Brígida.

1. Lipase. 2. Imobilização. 3. Suportes lignocelulósicos. 4. Grupamento Aldeído. 5.
Grupamento Tosila. I. Título.

CDD 660

JESSICA SILVA DE ALMEIDA MORAIS

NOVAS FUNCIONALIZAÇÕES NA FIBRA DA CASCA DE COCO VERDE VISANDO
UM SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 05/03/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof.a Dra. Morsyleide de Feitas Rosa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fábila Karine Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.a Dra. José Cleiton Sousa dos Santos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me ajudado nessa caminhada.

Segundo aos meus pais e ao meu esposo que sempre estão ao meu lado, me apoiando e me fortalecendo sempre que necessário.

Agradeço também à toda minha família que sempre torceu por mim

À FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Dr. Morsyleide de Freitas Rosa e a Dr. Ana Iraidy Santa Brígida, pela paciência e orientação.

À todos da família do Laboratório de Tecnologia da Biomassa, que me ajudaram sempre que eu precisei.

À toda equipe da Embrapa Agroindústria Tropical que tem me acolhido desde 2012.

E a todos que tenham me ajudado e porventura de alguma maneira eu não tenha mencionado!

Muito obrigada!

RESUMO

Vários materiais vêm investigados como potenciais suportes para imobilização de enzimas. Dentre eles destaca-se a fibra da casca de coco verde por ser bastante disponível, de baixo custo e rica em celulose e lignina. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo método para obtenção de um suporte para imobilização de enzimas, a partir da fibra da casca de coco verde. Inicialmente, foi avaliado a concentração de peróxido de hidrogênio mais eficiente para o pré-tratamento da fibra. A condição de 4,5% de peróxido de hidrogênio em pH 11,5 foi selecionada. Após esta etapa, dois métodos de funcionalização foram avaliados. Na funcionalização por oxidação com periodato de sódio o efeito de tempo e proporção fibra:reagente foram estudados e foram obtidos 198 μmol de grupos aldeído 1g de fibra. E para funcionalização com grupamentos tosila, foram testadas variações no tempo, na concentração de reagente e na base presente no meio. Com base em dados de impacto ambiental fornecidos pelo Software SimaPro e por Microscopia Eletrônica de Varredura utilizando Espectroscopia por Energia Dispersiva, foi possível constatar que a trietilamina foi a base que causou menor impacto ambiental negativo e maior capacidade de incorporar grupamentos tosila na fibra. As fibras brutas, pré-tratadas e funcionalizadas foram avaliadas quanto a estabilidade quando submetidas a diferentes meios reacionais (tampão fosfato pH 5, 7 e 9, etanol, etanol juntamente com óleo (1:1), e somente óleo), nas temperaturas 40 e 50°C, sob agitação e durante 7 dias. Análises de FTIR, TGA e colorimetria mostraram preservação da estrutura lignocelulósica e remoção de extrativos e ceras. As imobilizações utilizando lipase B de *Candida antarctica* (CALB) nas fibras funcionalizadas após o pré-tratamento (FF) e após a lavagem (FLF) ocorreram em condições de pH 7 e pH10, tempos de 2 e 24h e temperatura de 25°C. Foi possível imobilizar CALB em ambos suportes testados. Com maior atividade apresentada para a FF em pH 7 durante 24h, com valor de 1039 U/Kg. Foi possível tratar as fibras utilizando peróxido alcalino e funcionalizá-las com periodato de sódio para posteriormente realizar as imobilizações. Os testes com o cloreto de p-toluenosulfonila também se mostraram promissores, no entanto serão necessários estudos futuros para otimização da condição desta reação.

Palavras-chave: Lipase; Imobilização; Suporte lignocelulósicos; grupamento aldeído; grupamento tosila.

ABSTRACT

Several materials have been investigated as potential supports for immobilizing enzymes. Among them, the fiber of green coconut shell stands out because it is very affordable, and rich in cellulose and lignin. Thus, the objective of this work was to develop a new obtention method for supports to immobilize enzymes, from the fiber of the green coconut shell. Initially, the most efficient hydrogen peroxide concentration for fiber pretreatment was evaluated. The condition of 4.5% hydrogen peroxide at pH 11.5 was selected. After this stage, two functionalization methods were evaluated. In the functionalization by oxidation with sodium periodate the effect of time and fiber:reagent ratio were studied and 198 μmol of aldehyde 1g fiber groups were obtained. For the functionalization with tosyl groups, variations in time, reagent concentration, and in the base present in the medium were tested. Based on environmental impact data provided by the SimaPro Software and by Scanning Electron Microscopy using Dispersive Energy Spectroscopy, it was possible to verify that triethylamine was the base that caused the least negative environmental impact and greater capacity to incorporate tosyl groups in the fiber. Crude, pre-treated and functionalized fibers were evaluated for stability when subjected to different reaction media (phosphate buffer pH 5, 7 and 9, ethanol, ethanol together with oil (1: 1), and only oil), at temperatures 40 and 50 ° C, under stirring for 7 days. FTIR, TGA and colorimetry analyzes showed preservation of the lignocellulosic structure and removal of extracts and waxes. Immobilizations using *Candida antarctica* lipase B (CALB) in the functionalized fibers after pretreatment (FF) and after washing (FLF) occurred under conditions of pH 7 and pH 10, 2 and 24h and temperature of 25 °C. It was possible to immobilize CALB on both tested supports. The greater activity was presented by FF at pH 7 for 24h, with a value of 1039 U / Kg. It was possible to treat the fibers using alkaline peroxide and functionalize them with sodium periodate to later perform the immobilizations. Tests with p-toluenesulfonyl chloride have also shown potential, however future studies will be needed to optimize the condition of this reaction.

Keywords: Lipase; Immobilization; Lignocellulosic support; aldehyde group; tosyl group.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Classificação dos diferentes métodos para imobilização de enzimas .	20
Figura 2	– Representação do complexo lignocelulósico	22
Figura 3	– Estrutura da Celobiose	23
Figura 4	– Representação da estrutura das hemiceluloses	24
Figura 5	– Representação das unidades básicas da lignina	24
Figura 6	– Representação da estrutura irregular da lignina	25
Figura 7	– Estrutura básica da casca de coco verde	26
Figura 8	– Reação de oxidação com o periodato de sódio e imobilização	29
Figura 9	– Reação de tosilação e imobilização	30
Figura 10	– Esquema contendo as partes 1 e 2 do processo	31
Figura 11	– Curvas de dTG para FCCV, F4,5, F5,5, F6,5 e F7,5	45
Figura 12	– Espectros de FTIR para FCCV, F4,5, F5,5, F6,5 e F7,5	47
Figura 13	– Espectros de FTIR para FCCV, FF e FLF	49
Figura 14	– Imagens com aumento de 500x que mostram o efeito da remoção dos macrocomponentes na FL, F4,5 e FF em comparação a FCCV ...	50
Figura 15	– Curvas de dTG para FCCV, FF e FLF	51
Figura 16	– Valores obtidos através do Software SimaPro para comparação entre o impacto da trietilamina e da piridina	53
Figura 17	– Espectros de FTIR para as FCCV antes (a) e depois do teste de estabilidade, para as temperaturas 40°C (b) e 50°C (c)	55
Figura 18	– Espectros de FTIR para amostras de F4,5 antes (a) e depois do teste de estabilidade, para as temperaturas 40°C (b) e 50°C (c)	56
Figura 19	– Espectros de FTIR para as amostras de FF antes (a) e depois do teste de estabilidade, para as temperaturas 40°C (b) e 50°C (c)	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Condições utilizadas para os testes de funcionalização da fibra de coco verde com o NaIO_4	33
Tabela 2	– Condições para os testes de funcionalização da fibra de coco verde com cloreto de p-toluenossulfonila	35
Tabela 3	– Composição química da FCCV e das fibras tratadas com H_2O_2 com concentrações de 4,5%, 5,5%, 6,5% e 7,5% a 50°C , pH 11,5 por 2h..	43
Tabela 4	– Dados de termogravimetria para FCCV, F4,5, F5,5, F6,5 e F7,5	46
Tabela 5	– Valores referentes a formação de grupos aldeído em μmol para 1g de suporte	48
Tabela 6	– Valores percentuais de enxofre, obtidos por MEV-EDS, para F4,5 e FL submetidas aos testes com cloreto de p-toluenossulfonila	52
Tabela 7	– Dados de termogravimetria para as amostras de FCCV antes e depois do teste de estabilidade nas temperaturas de 40 e 50°C	58
Tabela 8	– Dados de termogravimetria para as amostras de F4,5 antes e depois do teste de estabilidade nas temperaturas de 40 e 50°C	58
Tabela 9	– Dados de termogravimetria para as amostras de FF antes e depois do teste de estabilidade nas temperaturas de 40 e 50°C	59
Tabela 10	– Valores de L^* , a^* e b^* para as amostras de FCCV após o teste de estabilidade, nas temperaturas de 40 e 50°C	60
Tabela 11	– Valores referentes a L^* , a^* e b^* para as amostras de F4,5 após o teste de estabilidade, nas temperaturas de 40 e 50°C	60
Tabela 12	– Índices de colorimetria para as amostras de FF após os testes de estabilidade, nas temperaturas de 40 e 50°C	61
Tabela 13	– Parâmetros de imobilização de CALB em FF sob duas condições de pH (7 e 10) e tempo de contato (2 e 24h)	62
Tabela 14	– Parâmetros de imobilização de CALB na FLF sob duas condições de pH (7 e 10) e tempo de contato (2 e 24h)	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Acidificação
EA	Eutrofização de água doce
ECOA	Ecotoxicidade em água doce
EM	Eutrofização marinha
ENC	Toxicidade humana, efeitos não cancerígenos
ERH	Esgotamento de recursos hídricos
ET	Fibra testada em etanol
ETE	Eutrofização terrestre
ET+OL	Fibra testada em etanol+óleo
F4,5	Fibra tratada com peróxido de hidrogênio na concentração 4,5% (m/v)
F5,5	Fibra tratada com peróxido de hidrogênio na concentração 5,5% (m/v)
F6,5	Fibra tratada com peróxido de hidrogênio na concentração 6,5% (m/v)
F7,5	Fibra tratada com peróxido de hidrogênio na concentração 7,5% (m/v)
FCCV	Fibra da casca de coco verde
FF	Fibra pré-tratada e funcionalizada com periodato de sódio
FL	Fibra lavada com água
FLF	Fibra lavada com água e funcionalizada com periodato de sódio
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada em fourier
GPTM	Glicidiloxipropilmetoxisilano
S	
MC	Mudanças climáticas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MEV-	Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia por energia
EDS	dispersiva
OL	Fibra testada em óleo
pNFL	P-nitrofenil laurato
TGA	Análise termogravimétrica

TP5	Fibra testada em tampão pH 5
TP7	Fibra testada em tampão pH 7
TP9	Fibra testada em tampão pH 9

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivos gerais.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1	Enzimas.....	17
3.1.1	<i>Lipases</i>	18
3.1.1.1	<i>Lipase B de Candida Antarctica</i>	18
3.2	Imobilização de enzimas.....	19
3.2.1	<i>Imobilização por ligação covalente em matriz insolúvel</i>	20
3.3	Materiais lignocelulósicos.....	21
3.3.1	<i>Celulose</i>	22
3.3.2	<i>Hemicelulose</i>	23
3.3.3	<i>Lignina</i>	24
3.3.4	<i>Fibra de coco verde</i>	25
3.4	Funcionalização de materiais lignocelulósicos para imobilização de enzimas.....	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	Obtenção da fibra de coco.....	32
4.1.1	<i>Moagem</i>	32
4.1.2	<i>Classificação</i>	32
4.1.3	<i>Lavagem</i>	32
4.2	Pré-tratamento.....	32
4.3	Funcionalização da fibra de coco.....	33
4.3.1	<i>Funcionalização com periodato de sódio</i>	33
4.3.1.1	<i>Quantificação dos grupamentos aldeído</i>	34
4.3.2	<i>Funcionalização com cloreto de p-toluenossulfonila</i>	34
4.3.2.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS)</i>	35
4.3.2.2	<i>Avaliação de impactos</i>	35
4.4	Teste de estabilidade do suporte em meio reacional.....	36
4.5	Caracterização das fibras.....	36

4.5.1	Composição química.....	36
4.5.1.1	<i>Holocelulose.....</i>	36
4.5.1.2	<i>α-celulose.....</i>	37
4.5.1.3	<i>Lignina Klason.....</i>	38
4.5.1.4	<i>Determinação do teor de cinzas.....</i>	38
4.5.1.5	<i>Determinação do teor de extrativos.....</i>	39
4.5.2	Análise termogravimétrica (TGA).....	39
4.5.3	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	40
4.5.4	Colorimetria.....	40
4.5.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	40
4.6	Imobilização por ligação covalente da lipase na fibra tratada/funcionalizada.....	40
4.6.1	Atividade hidrolítica em p-Nitrofenil Laurato.....	41
4.6.2	Teor de proteína.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
5.1	Pré-tratamento das fibras.....	43
5.1.1	Composição química das fibras.....	43
5.1.2	Análise termogravimétrica.....	44
5.1.3	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.....	46
5.2	Funcionalização da fibra de coco.....	47
5.2.1	Funcionalização utilizando periodato de sódio.....	47
5.2.1.1	<i>Determinação do teor de extrativos.....</i>	49
5.2.1.2	<i>Espectroscopia no infravermelho com Transformada em Fourier (FTIR)...</i>	49
5.2.1.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</i>	50
5.2.1.4	<i>Análise termogravimétrica (TGA).....</i>	51
5.2.2	Funcionalização utilizando o cloreto de p-toluenossulfonila.....	52
5.3	Teste de estabilidade do suporte.....	54
5.3.1	Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada em Fourier.....	54
5.3.2	Análise termogravimétrica (TGA).....	58
5.3.3	Colorimetria.....	60

5.4	Imobilização por ligação covalente de lipase da fibra tratada/funcionalizada.....	62
6	CONCLUSÕES.....	64
7	TRABALHOS FUTUROS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Os catalisadores são substâncias capazes de acelerar as reações através de um caminho alternativo, que exige uma menor energia de ativação que o caminho original. (ATKINS & JONES, 2019). A obtenção de determinados produtos por rota química, a exemplo de biodiesel, demanda o uso de catalisadores químicos, condições extremas de processo como alta temperatura, alta concentração de reagente e elevado tempo de reação (M. E. GONZÁLEZ *et al.*, 2017). Rotas exclusivamente químicas podem fornecer baixa especificidade e, consecutivamente, gerar produtos de composição química mista ou contaminados, e isso contribui para que haja etapas de purificação do produto (MENDES *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2017). As enzimas são consideradas catalisadores biológicos e seu uso pode ser uma alternativa promissora aos catalisadores usualmente empregados para realizar algumas reações de forma mais segura e econômica. Enzimas são responsáveis pela síntese da maioria das reações metabólicas nos seres vivos, elas são muito específicas e, em condições ambientais suaves de pH, temperatura e pressão são muito ativas (BARBOSA *et al.*, 2014). O alto grau de especificidade das enzimas dá a elas regioespecificidade, estereoespecificidade e capacidade de reagir apenas com o substrato de interesse. Estes fatores garantem que a formação de produtos indesejados podem ser evitada ou reduzida (KRAJEWSKA, 2004).

As lipases são uma categoria de enzimas muito utilizadas em processos biocatalisados devido ao fato de possuírem ampla especificidade e conseguirem catalisar vários tipos de reações (MANOEL *et al.*, 2015). Apesar de possuírem excelentes propriedades catalíticas, elas possuem características que não são adequadas para uso industrial, como baixa estabilidade, inibição por altas concentrações de substrato e produto, e baixa atividade e seletividade para substratos não naturais. Uma alternativa para viabilizar o processo é através da imobilização enzimática. A imobilização enzimática facilita o manuseio da enzima (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011), se feita corretamente aumenta a produtividade dos biocatalisadores e aprimora suas características (MOHAMAD *et al.*, 2015). Muitos materiais utilizados para suporte são considerados caros e difíceis de usar em escala industrial (ALBAYRAK; YANG, 2002) sendo demandados materiais que possam viabilizar esse processo e diminuir seus custos. Dentre os materiais de baixo custo, os lignocelulósicos possuem elevada resistência mecânica, são passíveis de

funcionalização e tem sido bastante promissores em relação a sua utilização como suporte para imobilização enzimática. Podemos citar o uso do algodão para imobilização de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, imobilização de tripsina em fios de algodão, imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em fibra de coco verde e imobilização de lipase de *Candida rugosa* em nanocelulose (ALBAYRAK & YANG 2002; BRÍGIDA et al. 2007; ELIAS et al. 2018; NIKOLIC et al. 2010).

Entre os materiais lignocelulósicos, temos a fibra da casca de coco verde que é um rejeito oriundo, principalmente, do consumo de água de coco. Para cada 100 kg de coco verde, cerca de 85 kg são cascas (MATTOS *et al.*, 2011). Os estudos com fibra de coco verde como suporte vão desde adsorção de lipase em fibra natural lavada com água a funcionalização com Glicidiloxipropilmetoxisilano (GPTMS), utilizando enzimas variadas como lipases e Lacases (BRÍGIDA et al., 2007; BRÍGIDA et al., 2008; CRISTÓVÃO et al., 2012; CRISTÓVÃO et al., 2011). A utilização desses materiais como suporte para imobilização enzimática seria mais uma alternativa para obtenção de um produto de alto valor agregado. No entanto, para obtenção de um derivado com maior estabilidade operacional em meio aquoso, a imobilização por ligação covalente é a estratégia mais usual. Para tanto, é necessário que o suporte possua grupos que possam se ligar quimicamente com a enzima. A fibra de coco não possui naturalmente esses grupamentos em sua composição; no entanto, é possível inseri-los através de funcionalização. Brigida et al. (2007) e Cristovão et al. (2012), funcionalizaram a fibra de coco com GPTMS, hidrolisaram a fibra com ácido sulfúrico e oxidaram com periodato de sódio. Bezerra e colab (2014) trabalharam utilizando dois agentes funcionalizantes, o glioxil e o glutaraldeído, onde após a funcionalização com o glioxil fez-se necessário uma etapa de oxidação com o periodato de sódio. Um método simples que tem sido amplamente usado para adição de grupamentos ligantes é a reação direta com periodato de sódio, que é capaz de oxidar os grupamentos de hidroxila dos carbonos C-2 e C-3 das unidades de anidroglicose presentes na celulose resultando em um dialdeído (KUMARI *et al.*, 2015; NIKOLIC *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2020). Esse dialdeído formado é capaz de imobilizar enzimas sem necessidade de etapas intermediárias, formando uma ligação estável diretamente entre a enzima e o suporte. Dessa forma, o presente trabalho busca desenvolver um novo método para obtenção de um suporte para imobilização de enzimas, a partir da fibra de coco, contendo grupamentos funcionais que permita a imobilização de lipase por ligação covalente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um novo método para obtenção de um suporte para imobilização de enzimas, a partir da fibra de coco verde, contendo grupamentos funcionais que permita a imobilização de lipase por ligação covalente.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar as condições para o pré-tratamento da fibra por oxidação alcalina para limpeza da superfície e remoção parcial da lignina presente na fibra;
- Inserir grupamentos funcionais na fibra de coco verde através de reações de oxidação ou substituição;
- Avaliar a estabilidade das fibras quando submetidas a diferentes meios reacionais;
- Avaliar o potencial de imobilização de lipase B de *Candida antarctica* nos suportes desenvolvidos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Enzimas

A velocidade das reações depende da barreira energética entre os reagentes e os produtos e essa barreira é chamada de energia de ativação, e para que haja reação as moléculas precisam de energia suficiente para ultrapassar essa barreira. Desta forma, as enzimas fornecem uma rota alternativa de baixa energia de ativação e assim maior velocidade da reação (CHOUDHURY, 2020). Enzimas são proteínas biocatalisadoras que participam em várias reações bioquímicas que ocorrem nos seres vivos e que possuem excelentes propriedades que permitem a realização de processos químicos em condições ambientais benignas (CHIBATA, 1986; MATEO *et al.*, 2007). São altamente específicas, pois tem capacidade de modificar apenas um substrato produzindo apenas um produto entre vários possíveis e são muito ativas sob condições ambientais brandas (BARBOSA *et al.*, 2014). Além da sua forma livre, elas podem ser encontradas naturalmente imobilizadas, geralmente em plantas, como é o caso das peroxidases e das oxidases (KOZAN *et al.*, 2007; WILLIAM *et al.*, 2002). O conteúdo dessas enzimas pode variar de acordo com a espécie vegetal e sua principal função é na atuação como proteção contra infecções virais e microbianas (VIGYÁZÓ; HAARD; VAMOS-VIGYAZO, 1981). A forma livre das enzimas não é indicada para interesses industriais, desta forma faz-se necessário etapas que possam vir a estabilizá-la (EIJSSINK *et al.*, 2005). Quando estabilizadas as enzimas podem ser utilizadas em vários setores da indústria têxtil, farmacêutica, de alimentos, de papel e celulose. Elas disso são divididas em seis classes, de acordo com o tipo de reação que elas catalisam (JUNQUEIRA PINTO BRITO *et al.*, 2016):

- Oxirredutases: São responsáveis por catalisar reações de oxirredução ou transferência de elétrons;
- Transferases: Transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil, entre outros;
- Hidrolases: Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente;
- Liases: Remoção de grupos deixando uma ligação dupla ou adição de grupos a duplas ligações;
- Isomerases: Reação de interconversão entre isômeros geométricos ou ópticos;

- Ligases: União entre duas moléculas, sempre utiliza energia.

3.1.1 Lipases

São enzimas capazes de hidrolisar óleos e gorduras presentes em emulsões ou gotas e geralmente possuem seu centro ativo e isolado do meio através de uma cadeia polipeptídica que atua como tampa (BARBOSA *et al.*, 2014). Na presença de óleos ou gorduras a tampa se move para que haja interação entre a sua face hidrofóbica com o meio, desta forma o centro ativo é exposto e a enzima é adsorvida no meio hidrofóbico, fenômeno chamado de ativação interfacial (RODRIGUES, RAFAEL C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Suas propriedades podem ser alteradas de acordo com as condições de reação, onde essas condições são capazes de alterar a sua conformação e desta forma melhorar o desempenho das condições de reação. São classificadas como hidrolases, pois catalisam a hidrólise de ésteres, produzindo ácido graxos livres, di e monogliceróis e glicerol (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015) e em baixas concentrações de água são capazes de atuar em reações de interesterificação, transesterificação e esterificação (RODRIGUES, CELSON *et al.*, 2016). Elas são produzidas por animais, microrganismos e plantas, atuam na renovação dos lipídios, facilitam a digestão e a mobilização de gordura no organismo. Possuem elevada enantioseletividade e regioseletividade, o que impede a formação de produtos indesejados. São utilizadas no tratamento de águas residuais oleosas através da bioconversão de óleos e gorduras, são aplicadas na síntese de fármacos, são utilizadas na formação do papel, no processamento de ingredientes de alimentos funcionais produção de alimentos assados, fermentação de vegetais para enriquecimento de laticínios, emulsionante de alimentos e na remoção de pitch (componentes hidrofóbicos da maneira) (DEMUNER; JUNIOR; ANTUNES, 2011; MEYER, 2010; RODRIGUES, CELSON *et al.*, 2016; SANCHEZ; DEMAINE, 2011; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

3.1.1.1 Lipase B de *Candida Antarctica*

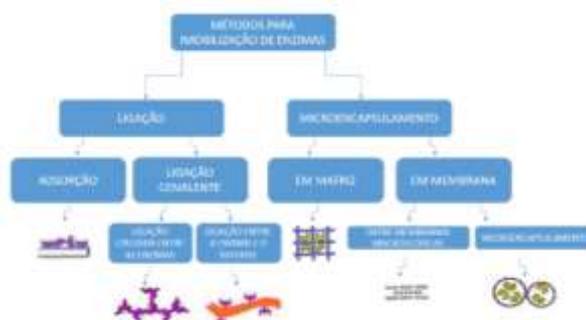
Candida antarctica é uma espécie de levedura capaz de produzir dois tipos de lipases diferentes, A e B. A Lipase A depende do cálcio e é muito termoestável, enquanto a Lipase B não depende do cálcio e um pouco menos termoestável. A

especificidade em relação ao substrato é diferente entre as duas, a lipase B é pouco reativa para triacilglicerídeos grandes e muito ativa para uma gama de ésteres, tióis e amidas, já a lipase A tem preferência por grupamentos éster e é ativa de maneira não específica em relação aos triglicerídeos (ANDERSON; LARSSON; KIRK, 1998). Entre todas as enzimas deste grupo, a Lipase B de *Candida antarctica* (CALB) possui mais alta aplicação em vários processos industriais, elevada enantiosseletividade, estabilidade em solventes orgânicos e ampla gama de substratos (STAUCH et al., 2015). A CALB pode ser utilizada tanto em sua forma livre, quanto em sua forma imobilizada. Podem ser utilizadas em fluidos supercríticos e em reações orgânicas tanto em meio aquoso quanto em reações livres de solventes, também pode ser utilizada na produção de R-Indanol, e na síntese de compostos farmacológicos (Souza et al., 2016; Foresti & Ferreira, 2005; Robert & Manoel, 2018).

3.2 Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas consiste em um confinamento em um suporte sólido e facilitando o seu reuso (MENDES et al., 2011). O desenvolvimento de técnicas para imobilização vem se destacando pois facilita a reutilização da enzima, favorece a separação dos produtos e aumenta a estabilidade em solventes orgânicos. De acordo com o modo de interação de entre a enzima e o suporte, os métodos de imobilização podem ser classificados em químicos e físicos. A imobilização por meio de retenção física, ocorre quando onde a enzima aprisiona-se a uma matriz polimérica, microcápsula ou membrana, e a imobilização pelo método químico ocorre quando há interação da enzima com matriz insolúvel e pelo uso de um reagente multifuncional que possibilita as ligações cruzadas (HAIDER; HUSAIN, 2009), como mostra a figura 1.

Figura 1. Classificação dos diferentes métodos para imobilização de enzimas de acordo com a IUPAC (1995)



Fonte: Elaborado pela autora

Dentre os métodos de imobilização, existem alguns que não conseguem fornecer a mesma possibilidade de formar uma ligação multipontual com a enzima e em alguns casos a enzima imobilizada pode se tornar menos estável que a enzima solúvel (TARDIOLI; PEDROCHE; GIORDANO, 2003). Por exemplo, a técnica de adsorção que apesar de apresentar baixo custo, ser uma técnica simples e apresentar capacidade de regeneração da matriz do suporte, ela também apresenta uma grande possibilidade de dessorção da enzima, devido a mudanças de temperatura, pH e força iônica (LIU; CHEN; SHI, 2018).

No método de ligação cruzadas intermoleculares, as enzimas são reticuladas na presença de um reagente bi ou multifuncional. No entanto a atividade catalítica da enzima pode diminuir durante o processo de reticulação (LIU; CHEN; SHI, 2018).

Em contrapartida, a técnica de imobilização por ligação covalente, forma uma ligação forte entre a enzima e o suporte. Nesta técnica ocorre interação entre os grupamentos amina, grupos carboxílicos, tirosina, treonina, entre outros grupos presentes na enzima com os grupos reativos do suporte (BRÍGIDA et al., 2010).

3.2.1 Imobilização por ligação covalente em matriz insolúvel

A imobilização por ligação covalente baseia-se na técnica de inserção de grupos reativos o suficiente para interagirem com os grupos nucleofílicos das enzimas, a interação formada entre a enzima e a matriz nesta técnica é mais forte que a interação formada por imobilização por adsorção e esta técnica evita o fenômeno da dessorção (CABRAL et al., 2012). Neste método é necessário conhecer os grupos funcionais presentes no suporte, para então ativá-los de maneira adequada. A

presença no suporte de grupamentos hidroxila, aldeídos ou carbonilas, são quem definem o tipo de ativação que será aplicada. As enzimas possuem grupos funcionais como aminas, grupos carboxílicos, grupos fenólicos da tirosina, grupo sulfídrico da cisteína, grupo hidroxílico da serina, treonina e tirosina, grupo imidazol da histina e grupo indol do triptofano (BRÍGIDA *et al.*, 2010), eles são capazes de se ligar com os grupamentos reativos do suporte e a interação entre ambos é quem rege o bom desempenho do suporte. Na imobilização por ligação covalente a ligação entre o suporte e a enzima é mais forte e duradoura, no entanto pode haver perda da atividade enzimática (BARBOSA *et al.*, 2014; MATEO *et al.*, 2007). Diante desta dificuldade muitos estudos têm tentado aprimorar esta técnica, de forma que a enzima possa manter sua estrutura conformacional, possa se tornar mais estável e que possa manter ou aumentar sua atividade catalítica. As principais vantagens desta técnica são proporcionar ao biocatalisador maior resistência em relação ao pH, temperatura e influência de solventes orgânicos, os suportes preparados podem ser aplicados em vários tipos de reatores como, fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado (CARDOSO; DE MORAES; CASS, 2009; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

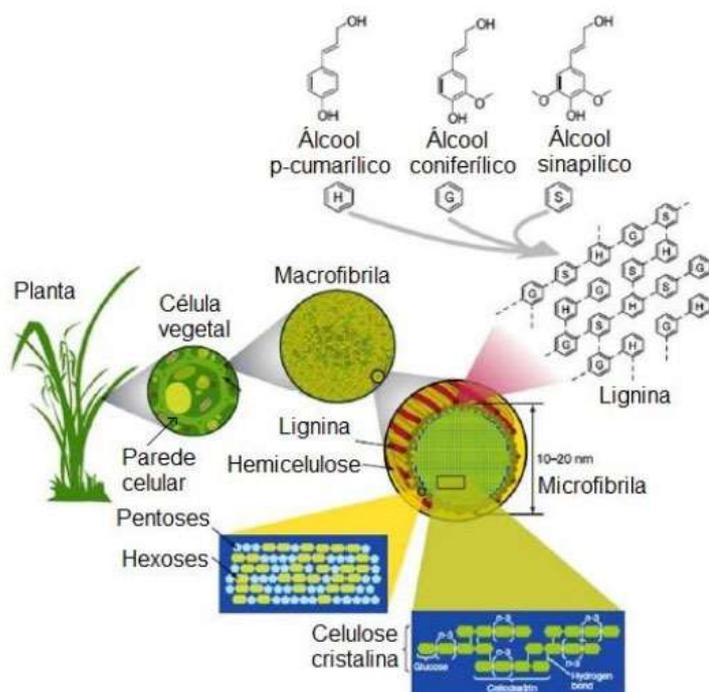
Dentre os diferentes suportes empregados para imobilização de enzimas, os materiais lignocelulósicos vêm se destacando devido a sua biodegradabilidade, elevada disponibilidade, atoxicidade e elevada quantidade de grupos hidroxila reativos (CHOUHDURY, 2018). Essas características agregam valor a esse material e o tornam objeto de estudo dentro da área de imobilização enzimática. A literatura relata diversos trabalhos com grande variedade de suportes e enzimas. (ALBAYRAK & YANG, 2002; BEZERRA *et al.*, 2014; BRÍGIDA *et al.*, 2007; CRISTÓVÃO *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2016; NIKOLIC *et al.*, 2010).

3.3 Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são de origem vegetal, e são ricos em carboidratos e são considerados matéria prima de grande interesse industrial (ANWAR *et al.*, 2014). Eles são compostos por polímeros de carboidratos fortemente ligados (celulose e hemicelulose) e um polímero aromático (lignina) (SUN; OTHMAN, 2019), embora possam apresentar teores diferentes. Eles também apresentam, em menor quantidade frente aos compostos anteriores, extrativos e cinzas. Os extrativos

são provenientes da matéria orgânica e as cinzas são provenientes de compostos inorgânicos absorvidos pela planta em seu crescimento. Esses componentes estão representados na Figura 2.

Figura 2. Representação do complexo lignocelulósico

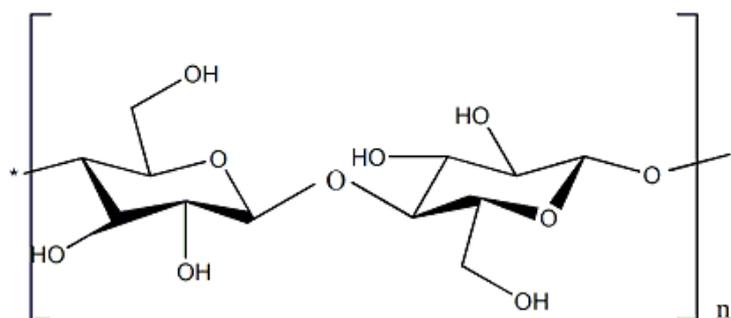


Fonte: Rubin (2008)

3.3.1 Celulose

A celulose é o polímero natural mais abundante da natureza (WIDIYASTUTI *et al.*, 2019). Em geral ela é resistente e desempenha um papel essencial na manutenção da estrutura das plantas. Possui estrutura linear e suas unidades β-D-glicopiranosose (C₆H₁₀O₅)_n são unidas por ligações glicosídicas β (1→4), sendo a celobiose a unidade repetitiva do polímero. A celobiose é formada por duas unidades de anidroglicose (AGU), que em relação ao plano da unidade seguinte estão espacialmente rotacionadas a 180° (Figura 3) (HABIBI, LUCIA & ROJAS, 2010).

Figura 3. Estrutura da Celobiose



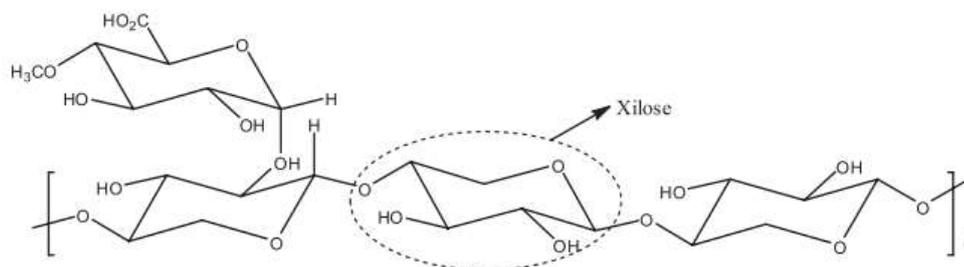
Fonte: Elaborado pela autora

A junção de 18 cadeias de celulose dá origem as microfibrilas, que são incorporadas as hemiceluloses e a lignina formando a parede celular vegetal (HABIBI, LUCIA, & ROJAS, 2010). A presença de grupos hidroxila (OH-) livres nas unidades de anidroglicose apresenta uma forte tendência a formar ligações de hidrogênio. As ligações de hidrogênio intra e intermolecular são responsáveis pela manutenção das redes cristalinas e torna a celulose resistente a tratamentos químicos e biológicos. É devido esse arranjo que as cadeias são rígidas e as microfibrilas de celulose se organizam apresentando regiões cristalinas alternadas com regiões amorfas.

3.3.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos, com estrutura química variada e altamente ramificada, pois possui uma grande variedade de componentes poliméricos (Figura 4). As hemiceluloses são constituídas por diferentes tipos de sacarídeos, tais como D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, D-arabinose (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Devido à combinação de diversos açúcares e por apresentarem uma estrutura amorfa, as hemiceluloses são mais solúveis em água, mais susceptíveis ao ataque de ácidos e bases e mais fáceis de serem degradadas que a celulose (LI *et al.*, 2010). O termo utilizado para o englobamento de celulose e dos demais carboidratos, denominados em conjunto como hemiceluloses, é holocelulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

Figura 4. Representação da estrutura das hemiceluloses

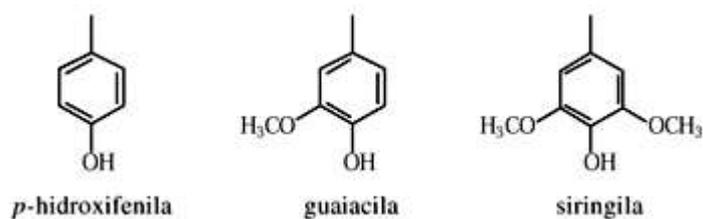


Fonte: Elaborado pela autora

3.3.3 Lignina

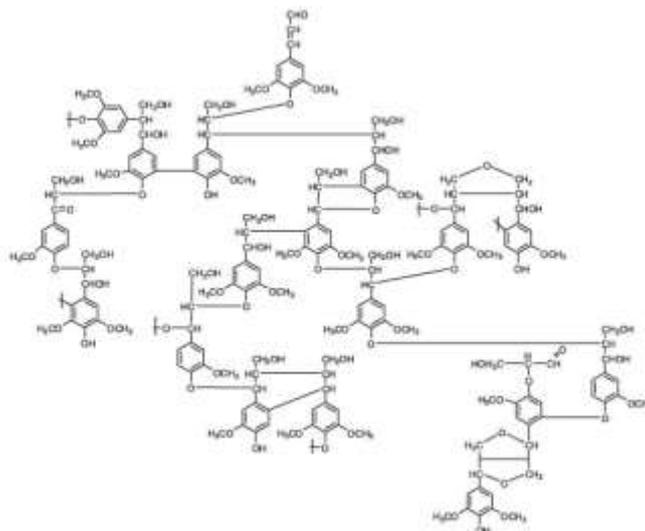
A lignina é um heteropolímero amorfo que é formado por três unidades básicas a *p*-hidroxifenila (H), a guaiacila (G) e a siringila (S) (Figura 5). Ao contrário de hemicelulose que é um heteropolímero fácil de ser decomposto, a lignina possui uma maior resistência pois é um material mais polimerizado, o que gera uma estrutura mais rígida (CAO *et al.*, 2019). Ela confere à planta suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. Além disso é o componente polimérico da madeira com maior capacidade de absorver energia ultravioleta e visível. Sua estrutura é amorfa e irregular (Figura 6). A quantidade de cada uma dessas unidades pode variar de acordo com a localização, do clima e da idade da fonte do material lignocelulósico.

Figura 5. Representação das unidades básicas da lignina



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 6. Representação da estrutura irregular da lignina



Fonte: Elaborado pela autora.

3.3.4 Fibra de coco verde

A fibra de coco verde é um dos materiais lignocelulósicos abundantes no Brasil. O coqueiro (*Cocos nucifera*) pode ser cultivado em várias regiões tropicais, mas está mais presente nas regiões litorâneas e é amplamente cultivado em todo o mundo para consumo, embelezamento e controle de erosão (BELLO et al., 2019). O consumo da água de coco é o principal meio de comercialização desta planta. A água de coco pode ser vendida tanto no mercado informal, onde é comercializada dentro do próprio fruto, como após envasamento por indústrias especializadas. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2017 a produção de coco verde no Brasil foi de 1,8 bilhão de frutos, onde 74,5% da produção foi somente a região Nordeste, tendo como maiores produtores os estados de Bahia, Sergipe, Ceará e Pernambuco. A deposição destas cascas em lixões e aterros gera gastos relacionados à coleta, transporte e armazenamento das mesmas, além disso, podem ser um foco para a proliferação de vários vetores de doenças. A utilização das fibras de coco como matéria-prima para a produção de novos materiais com aplicações inovadoras contribui para aumentar o seu interesse industrial e econômico.

A casca de coco em geral é formada por uma camada mais externa, denominada epicarpo, uma camada mais fibrosa, de nome mesocarpo, uma camada mais rígida onde existe a fibra de coco, o endocarpo, e uma camada comestível o endosperma carnoso (Figura 7). E após o processamento do mesocarpo há obtenção

do pó do coco, que corresponde a 70% do material obtido. O pó pode ser utilizado para adsorção de cobre em efluente contaminados, como substrato agrícola, entre outras aplicações (CHAVES & NEVES, 2019; MATTOS *et al.*, 2011).

Figura 7. Estrutura básica da casca de coco verde



Fonte: Equipe Biopoint.com.br (2017)

A fibra de coco é composta majoritariamente por celulose, lignina e hemicelulose, no entanto o percentual dessa composição pode variar de acordo com a localização geográfica, condições climáticas, idade da planta, entre outros. A literatura mostra diferentes valores percentuais para a composição química da fibra, podendo variar entre 24-45% para celulose, 35-43% para lignina e 12-25% para hemiceluloses (BRÍGIDA *et al.*, 2010; CABRAL *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2016; STELTE *et al.*, 2019).

Dentre as várias maneiras de reaproveitar a FCCV estão: obtenção de nanocristais de celulose; reforço em concreto de resistência média, em reforço de compositos poliméricos, aplicação em compósitos a base de baquelite, confecção de vasos, briquetes, manta trançada para isolamento térmico e acústico (ABHEMANYU *et al.*, 2019; KHAN & ALI, 2018; MATTOS *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2014). Essa gama de possibilidades torna a fibra de coco um material bastante versátil. Devido à sua composição, resistência mecânica e abundância, a FCCV também vem sendo estudada como suporte para imobilização de enzimas (BORGIO, 2011; BRÍGIDA *et al.*, 2007; COSTA-SILVA *et al.*, 2013; CRISTO *et al.*, 2012; ITTRAT *et al.*, 2014; SAMANTA *et al.*, 2009). O desenvolvimento de tecnologias de reaproveitamento para fibra de coco contribui para a diminuição dos resíduos sólidos em aterros e lixões e agrega mais valor a este material, normalmente considerado rejeito.

3.4 Funcionalização de materiais lignocelulósicos para imobilização de enzimas

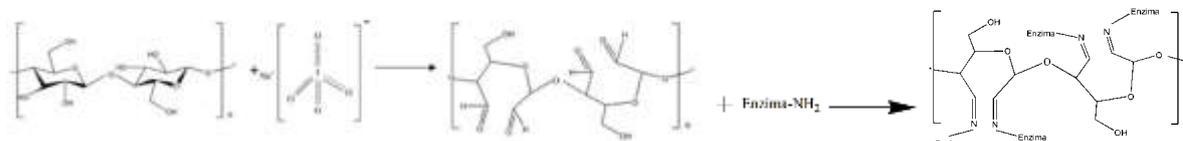
O uso de materiais mais sustentáveis que os sintéticos, pode contribuir para diminuição dos custos relacionados a imobilização e facilitar sua implementação industrial. Entre os vários tipos de suporte para fixação das enzimas a celulose e seus derivados são considerados ideais, pois são baratos, não tóxicos, renováveis e biodegradáveis (CHOUDHURY, 2018). Nikolic et al. (2010) estudaram a imobilização de Tripsina em algodão oxidado com periodato de sódio, produzindo um suporte que melhorou a estabilidade de armazenamento da enzima e também a sua atividade quando imobilizada. Além disso ele também estudou o efeito do tempo na etapa de funcionalização com o periodato de sódio através da quantificação dos grupamentos aldeído e o valor máximo que ele conseguiu foi de 100 μ mol/g. Albayrak & Yang (2002) trabalharam com tecido de algodão como suporte, mas a enzima utilizada foi *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. Após a imobilização, a estabilidade térmica da enzima aumentou em torno de 25 vezes. Zhang et al. (2020), obtiveram esferas de celulose a partir de algodão para imobilização de CALB, utilizando glutaraldeído para auxiliar na funcionalização. De Souza et al. (2016), imobilizaram Lipase B de *Candida antártica* (CALB) em bagaço de caju funcionalizado com glutaraldeído, obtendo uma carga máxima de 30mg de proteína/g de suporte mantendo uma conversão de 50% em até 5 ciclos de reuso. Brígida et al. (2007) também imobilizaram CALB, mas em um suporte diferente, o suporte foi fibra da casca de coco verde, utilizando 3-glicidiloxipropiltrimetoxisilano (GPTMS) como agente funcionalizante e posteriormente esse agente foi oxidado com periodato de sódio. A enzima imobilizada em pH10 se mostrou 363 vezes mais estável que a enzima livre e nesse mesmo pH houve um aumento na estabilidade térmica da enzima. Muitos suportes inorgânicos possuem baixa compatibilidade, o que pode gerar um efeito negativo na preservação da atividade enzimática. Sendo assim, faz-se necessário procurar suportes que sejam mais compatíveis, renováveis, estáveis e que possuam grupos funcionais adequados para imobilização (ZHANG et al., 2020). Tais fatores mostram que os materiais lignocelulósicos podem ser considerados uma opção de suporte capaz de substituir os materiais sintéticos.

Diante da versatilidade dos materiais lignocelulósicos, seu campo de aplicação tem crescido e a modificação química da superfície desses materiais tem sido objeto de estudo de muitas pesquisas. A modificação química da superfície

desses materiais vem sendo usada para aumentar a sua funcionalidade. Estudos recentes mostram que as fibras funcionalizadas podem ser aplicadas em absorção de óleo, catalisador na produção de biodiesel e funcionalização para imobilização de enzimas, utilização de tratamento com plasma para compatibilizar fibras de coco com amido termoplástico (BRÍGIDA *et al.*, 2007; DE FARIAS *et al.*, 2017; GONZÁLEZ *et al.*, 2017; TELI *et al.*, 2017). A funcionalização ocorre através de reações químicas e a raiz dessas reações deriva principalmente das interações entre os materiais envolvidos. Baseado nesse princípio, são necessários processos específicos para que a reação possa ocorrer de maneira eficaz.

A suscetibilidade de materiais fibrosos em sofrer reações como oxidação e substituição vem devido a presença dos grupamentos hidroxila presentes principalmente nas cadeias de celulose. A compatibilidade da celulose é vantajosa pois tende a manter a conformação das proteínas, o que pode garantir a atividade enzimática ao final do processo de imobilização (ZHANG *et al.*, 2020). Essas reações são capazes de tornar a fibra mais reativa com outros grupamentos capazes de formar ligações covalentes, como as bases de Schiff entre os grupos amina presentes nas enzimas e grupamentos aldeídos nos suportes (TRAN 2011). A modificação química da celulose com agentes oxidantes pode formar grupamentos como aldeído, cetona e carboxil; no entanto isso depende das condições de oxidação e dos agentes oxidantes (NIKOLIC *et al.*, 2010). Existem vários tipos de oxidação, dentre elas estão a oxidação mediante o radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO) e a oxidação com o periodato de sódio (FATHI *et al.*, 2017; NIKOLIC *et al.*, 2010). O tratamento mediado a TEMPO é um método de oxidação seletivo que oxida grupos hidroxilas de álcoois primários e a oxidação com periodato de sódio é altamente específica para converter as hidroxilas vicinais presentes nos carbonos C2 e C3 das cadeias de celulose em dialdeídos (Figura 7) (KIM *et al.*, 2000). Desde a descoberta da clivagem do diol vicinal, o periodato vem sendo amplamente estudado para reações oxidativas (SUDALAI; KHENKIN; NEUMANN, 2015). A reação de oxidação com periodato de sódio minimiza a degradação e mantém as propriedades morfológicas dos materiais de partida (NIKOLIC *et al.*, 2010).

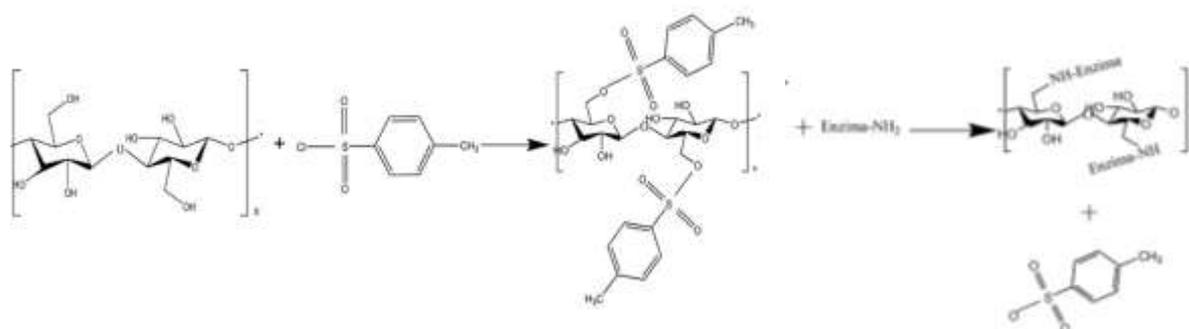
Figura 8. Mecanismo de reação de oxidação com o periodato de sódio e imobilização (Kumari *et al.*, 2015)



Fonte: Elaborado pela autora.

As reações de substituição podem ocorrer nas moléculas de celulose, principalmente nos grupamentos hidroxilas dos álcoois primários. A reação de sulfatação da celulose é um tipo de reação de substituição e essa reação pode ser feita através de vários métodos utilizando reagentes como ácido sulfúrico, trióxido de enxofre e cloreto de p-toluenosulfonila ou tosilato (SCHWEIGER, 1972). O tosilato é comumente utilizado em reações de imobilização em suporte de material insolúvel, e essa reação com o cloreto de p-toluenosulfonila dá origem a um éter sulfonado, que é um bom grupo de saída bastante reativo com aminas primárias (HERMANSON, 2013). A reação ocorre em condições básicas utilizando tampões aquosos ou em condições não aquosas utilizando uma base orgânica capaz de catalisar o processo. Normalmente as bases utilizadas são piridina, trietilamina (TEA), dimetilaminopiridina (DMAP) ou diisopropiletilamina (DIEA). O éster sulfonil formado é um grupo reativo eletrofílico capaz de ligar-se a nucleófilos para formar uma ligação covalente (HERMANSON, 2013). Isso se mostra uma grande vantagem quando se trata de formar uma ligação covalente entre a enzima e o suporte (NILSSON; MOSBACH, 1984) (Figura 9).

Figura 9. Mecanismo de reação de tosilção e imobilização baseado em (ALBAYRAK; YANG, 2002)



Fonte: Elaborado pela autora.

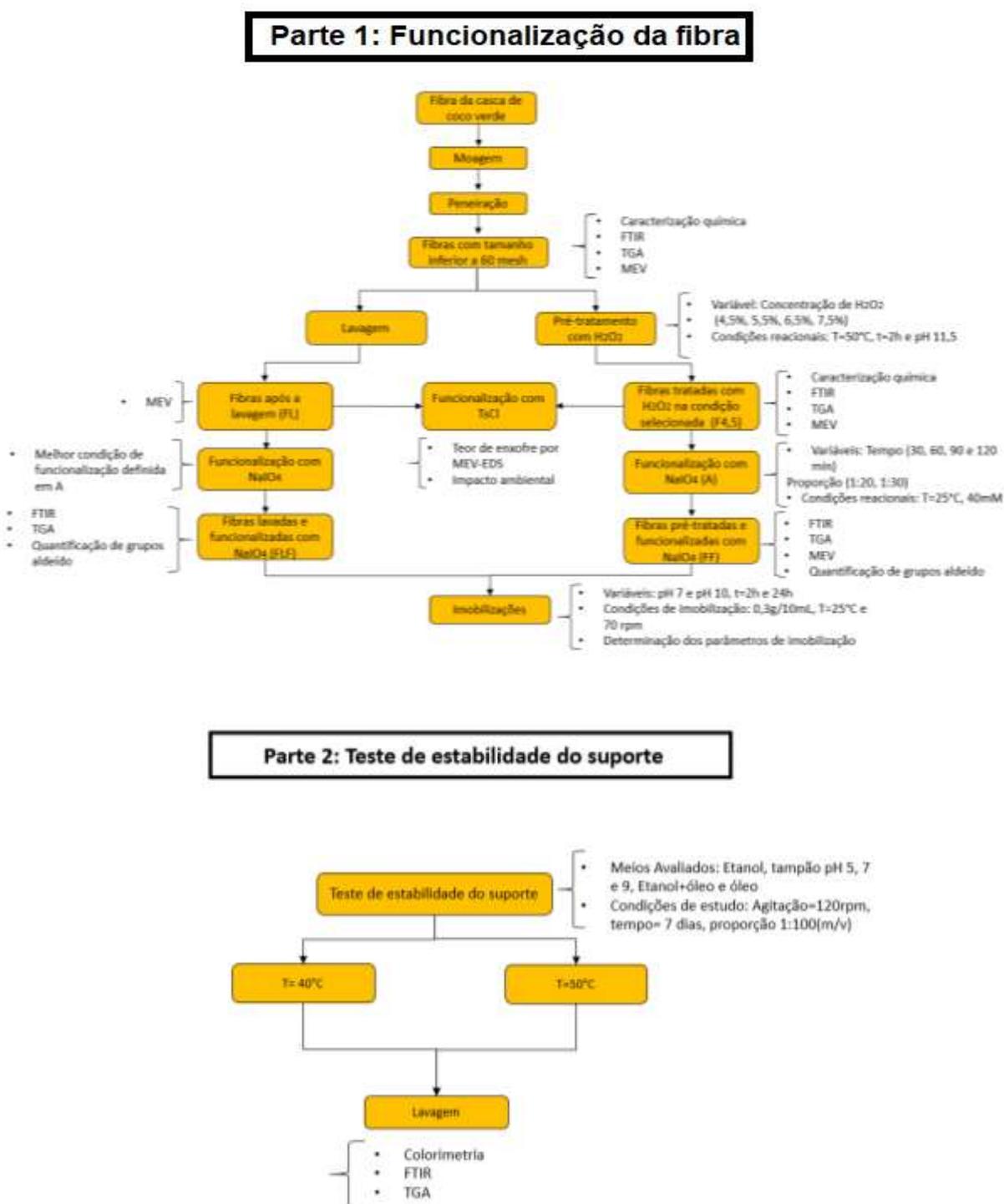
Pode-se encontrar na literatura enzimas imobilizadas em fibra da casca de coco verde, no entanto os métodos utilizados fazem uso de etapas intermediárias para inserção dos grupamentos necessários para posterior oxidação com periodato (BEZERRA *et al.*, 2014; BRÍGIDA *et al.*, 2007; CRISTÓVÃO *et al.*, 2012). Devido a presença de hidroxilas nos carbonos C2 e C3 nos monômeros da celulose, é possível que haja oxidação e formação de grupos dialdeído diretamente na celulose (KUMARI *et al.*, 2015). Desta forma, a enzima é capaz de formar bases de Schiff diretamente na superfície da fibra, sem necessidade de mais etapas. Para a reação com cloreto de p-toluenosulfonila não foram encontrados estudos mostrando o efeito do mesmo em fibra de coco, apenas para outros materiais lignocelulósicos como foi o caso de Albayrak *et al.* (2002). A busca por este novo método pode ser vista como algo inovador, conseqüentemente, agregando mais valor a este material. Desta forma, a fibra da casca de coco verde se mostra uma alternativa viável para atuar como suporte funcionalizado em imobilização de enzimas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento de um suporte funcionalizado a partir de fibra de coco, estudou-se inicialmente a influência da variação de concentração de peróxido de hidrogênio como pré-tratamento, em seguida estudou-se também a influência que o tempo e a proporção causam na reação de oxidação com o periodato de sódio. A influência do tempo, da base e da concentração de cloreto de p-toluenosulfonila presentes na reação também foram estudados. Além disso, fez-se também um estudo

imobilizando CALB nas fibras oxidadas e sem pré-tratamento. Paralelo a todas as etapas foi feito um estudo de estabilidade do suporte. A figura 10 mostra o esquema contendo as etapas do processo.

Figura 10. Esquema contendo as partes 1 e 2 do processo



Fonte: Elaborado pela autora.

4.1 Obtenção da fibra de coco

As fibras de coco alongadas, foram cedidas por indústrias locais, processadas em uma unidade piloto de beneficiamento da casca do coco verde e cedidas pela unidade de Paraipaba-CE da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT).

4.1.1 Moagem

A fibra da casca de coco verde (FCCV) foram inicialmente moídas em moinho de facas (Fritsch, Pulverisette 25) com peneira de 5 mesh. Em seguida a fibra foi moída novamente em um outro moinho de facas (Fritsch, Pulverisette 16) com peneira de 20 mesh.

4.1.2 Classificação

As fibras moídas foram passadas em peneira vibratória (Fritsch, Analysette 3) e as frações selecionadas para os estudos seguintes foram inferiores a 60 mesh.

4.1.3 Lavagem

Uma parcela do lote de fibras peneiradas foi submetida a dez lavagens com água obedecendo a proporção de 1:100 (m/v), à temperatura ambiente alternando tempos entre 1h e 30min. As fibras lavadas (FL) foram filtradas à vácuo e secas em estufa de 50°C durante 24h.

4.2 Pré-tratamento

Visando a manutenção do teor de celulose e remoção parcial de lignina, foi estudada a variação da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no tratamento da FCCV. As amostras foram oxidadas com soluções aquosas de H_2O_2 nas seguintes concentrações 4,5%, 5,5%, 6,5% ou 7,5% (m/v) em pH 11,5, ajustado com NaOH 60% (m/v). A proporção utilizada foi de 1g de fibra para 50 mL de solução, temperatura de 50°C e rotação de 250 rpm por 2 h, utilizando agitador mecânico. Após o tratamento, as fibras pré-tratadas foram filtradas a vácuo, lavadas com água até pH neutro e secas

em estufa a 50°C durante 24h. As amostras obtidas foram denominadas F4,5, F5,5, F6,5 e F7,5, para as condições de 4,5%, 5,5%, 6,5% e 7,5%, respectivamente.

4.3 Funcionalização da fibra de coco

4.3.1 Funcionalização com periodato de sódio

A variação no tempo de oxidação e a proporção fibra:solução foram estudadas nas fibras pré-tratadas e a melhor condição foi aplicada para a FL, produzindo a fibra lavada funcionalizada (FLF). A reação de oxidação foi conduzida em condição estática, com solução de periodato de sódio a 40mM (m/v), à 25°C e durante 30 min. Todas as reações foram feitas em triplicata. Os parâmetros variados estudados podem ser observados na tabela 1:

Tabela 1. Condições utilizadas para os testes de funcionalização da fibra de coco verde com o NaIO_4

TESTE	Proporção (m/v)	Tempo (min)
1	1:20	30
2	1:20	60
3	1:20	90
4	1:20	120
5	1:30	30
6	1:30	60
7	1:30	90
8	1:30	120

Fonte: Elaborado pela autora.

Para escolha da fibra funcionalizada (FF) mais adequada, foram quantificados os grupamentos aldeído produzidos através da oxidação das fibras.

4.3.1.1 Quantificação dos grupamentos aldeído

A quantificação dos grupamentos aldeído das amostras do tópico 4.5, foi dada pelo método de redução desses grupamentos através da reação com iodeto de potássio (KI). O iodo presente na solução produz uma coloração amarelada, e por meio da intensidade dessa coloração é possível saber sua concentração através da absorção da luz visível. Inicialmente preparou-se uma solução de iodeto de potássio 10%(m/v) e misturou-se com uma solução saturada de Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3), em proporção 1:1, essa solução final foi denominada solução A. O espectrofotômetro utilizado foi um Shimadzu® tipo UV-2450. Para zerar o espectrofotômetro foi utilizado 100 μL de água e 3mL da solução A. Uma amostra de 100 μL da solução de NaIO_4 foi lida juntamente com 3mL da solução A e o comprimento de onda (λ) escolhido foi onde a absorbância mais se aproximou de 0,7. Durante a reação de oxidação com o NaIO_4 , a cada 30 minutos foram retiradas alíquotas de 100 μL das amostras. Essas alíquotas foram lidas no espectrofotômetro juntamente com 3mL de solução A. A quantidade de grupamentos aldeídos presentes no suporte foi calculada de acordo com as equações (1 e 2) (Guisan, 1988):

$$G_A Si = \frac{Abs_{amostra} * G_A So}{Abs_{padrão}} \quad (1)$$

$$G_A Su = 200 - G_A Si \quad (2)$$

Sendo:

$G_A So$ a quantidade de periodato inicialmente disponível para cada 1g de fibra funcionalizada (μmol);

$Abs_{amostra}$ o valor de absorbância da amostra para o λ definido;

$Abs_{padrão}$ o valor de absorbância padrão lido próximo a 0,7;

$G_A Si$ a quantidade de periodato que não reagiu após um dado tempo de contato com a fibra (μmol);

$G_A Su$ a quantidade de grupos aldeído presentes em 1g de suporte (μmol);

4.3.2 Funcionalização com cloreto de p-toluenossulfonila

Todos os testes com o cloreto de p-toluenossulfonil foram feitos para a F4,5 e para a FL foram testadas apenas as condições 1 e 2 da tabela 2. Os testes foram

realizados de acordo com as metodologias adotadas por Albayrak e Yang (2002) e Rahma e colab. (2016). A tabela 2 detalha as condições testadas:

Tabela 2. Condições para os testes de funcionalização da fibra de coco verde com cloreto de p-toluenossulfonila

Teste	T (°C)	T (h)	Base	V _{base} (mL)	Solvente	V _{solvente} (mL)	Mamostra (g)
1	25	21	Trietilamina	11,84	Água	160	4
2	25	3	Piridina	10	Acetona	10	1
3	25	3	Trietilamina	11,84	Acetona	10	1

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia por energia dispersiva (MEV-EDS)

Para determinação do percentual de enxofre na superfície das fibras foi utilizada a técnica de MEV-EDS como forma de mapear quimicamente pontos da superfície da amostra. Foi utilizado um microscópio eletrônico de bancada tipo TM 3000 da HITACHI com periférico acoplado SWIFT ED 3000. As análises foram realizadas a 15kV de tensão de aceleração de elétron.

4.3.2.2 Avaliação de impactos

Visando menor impacto no processo de obtenção do suporte funcionalizado, os solventes testados na funcionalização com grupamentos tosila foram avaliados quanto ao impacto ambiental causado por eles utilizando o software SimaPro 9.0.0.35. Os critérios avaliados foram: mudanças climáticas (MC), toxicidade humana, efeitos não-cancerígenos (ENC), toxicidade humana, efeitos cancerígenos (EC), acidificação (AC), eutrofização terrestre (ET), de água doce (EA) e marinha (EM), ecotoxicidade em água doce (ECO), e esgotamento de recursos hídricos (ERH) (Comissão Europeia, 2010).

4.4 Teste de estabilidade do suporte em meio reacional

Visando avaliar a estabilidade química das fibras quando submetidas à diferentes meios reacionais, um estudo foi realizado variando meios reacionais e temperaturas em que esse suporte poderá ser empregado. Para os testes de estabilidade, as fibras foram mantidas durante 1 semana em incubadora shaker (Tecno®, TE-420) com velocidade de 200 rpm, onde variou-se os meios reacionais e as temperaturas. As fibras testadas foram as FCCV, FPT e FF. Os meios reacionais foram etanol, etanol+óleo, óleo, tampão fosfato em pH 5, 7 e 9, e as temperaturas testadas foram 40 e 50°C, com proporção 1:100 (m/v) de fibra em relação ao meio. As análises de termogravimetria, colorimetria e espectroscopia na região do infravermelho por transformada em Fourier foram realizadas para caracterização das amostras após os tratamentos propostos.

4.5 Caracterização das fibras

4.5.1 Composição química

A composição química completa foi para as amostras de FCCV e F4,5. Já as amostras tratadas peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas seguintes concentrações 4,5%, 5,5%, 6,5% e 7,5% (F4,5, F5,5, F6,5 e F7,5), foram caracterizadas apenas com teores de holocelulose, α-celulose e lignina klason. As amostras foram caracterizadas de acordo com as normas TAPPI T 203 cm-99 (2009), T 204 cm-97(1997), T 211 om-02 (2002), T 222 om-02 (2002), T 550 om-03 (2008), adaptadas por Moraes e colaboradores (2010).

4.5.1.1 Holocelulose

Na determinação de holocelulose foram pesados separadamente aproximadamente 3 g de cada uma das amostras e adicionou-se 120 mL de água destilada a esse conteúdo. A mistura reacional foi aquecida e mantida a 70 °C. Foram adicionados 2,5 g de clorito de sódio a amostra e 1mL de ácido acético glacial, com agitação constante. E a cada 1 h foi acrescentado novamente 2,5 g de clorito de sódio e 1 mL de ácido acético, o processo foi repetido mais duas vezes e contou-se mais 3

h de reação. O sistema foi desligado e a amostra foi filtrada com água destilada até pH neutro, dentro da capela, em um funil de vidro sinterizado nº 2, previamente seco, pesado e identificado. O funil foi seco em estufa a 105 °C durante 24 h e em seguida teve sua massa aferida. O teor de holocelulose foi calculado com base na seguinte equação (5):

$$\frac{MFH - MF}{MA} * 100 = TH\% \quad (5)$$

Onde:

MFH: Massa do funil somada a holocelulose após secagem em estufa

MF: Massa do funil limpo e seco

MA: Massa de cada amostra:

4.5.1.2 α -celulose

Para a determinação de α -celulose, foi pesado aproximadamente 1 g de cada uma das amostras de holocelulose e colocado em um almofariz. Foi adicionado 15 mL de solução de NaOH 17,5% a cada amostra e foi deixado em contato durante 2min. Em seguida cada amostra foi macerada durante 8 min. Terminado esse tempo, foi adicionado 40 mL de água destilada à amostra macerada e o conteúdo foi transferido para um funil de vidro sinterizado nº 2, previamente identificado e pesado. O conteúdo foi filtrado com água destilada até obtenção de um pH neutro. O funil foi deixado em estufa a 105 °C durante 24 h e e, seguida teve sua massa aferida. O cálculo do teor de α -celulose foi baseado na equação (6):

$$\frac{MFA - MF}{MAH} \times 100\% = TA\% \quad (6)$$

Onde:

MFA: Massa do funil somada a α -celulose

MF: Massa do funil limpo e seco

MAH: Massa de cada amostra de holocelulose

4.5.1.3 Lignina Klason

Para a determinação da lignina Klason foi adotada a norma TAPPI T 222 om-22 (2002) com pequenas modificações. Pesou-se cerca de 1 g de amostra seca e transferiu-se para um almofariz contendo 17 mL de H₂SO₄ 72%. O sistema foi deixado em repouso durante 24 h. Passado o tempo de reação, o material foi diluído em 306 mL de água destilada e colocado sob refluxo durante 4 h de reação. A amostra foi filtrada em funil de vidro sinterizado nº 4 e seca em estufa a 105 °C durante 24 h. O funil foi resfriado em dessecador até massa constante e pesado. O teor de lignina Klason foi determinada pela equação (7):

$$\left(\frac{MFL - MF}{MA}\right) \times (1 - TC) \times 100 = TLI\% \quad (7)$$

Onde:

MFL- Massa do funil + lignina após estufa

MF – Massa do funil limpo e seco

MA - Massa de cada amostra

TC – Teor de cinzas da lignina em fração

TLI – Teor de lignina insolúvel em percentual

4.5.1.4 Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas foi feita em duplicata, utilizando 1,5 g de cada amostra, adicionado aos cadinhos previamente calcinados a 600 °C por 30 min, pesados e identificados. O conjunto foi colocado em forno mufla a 600 °C, durante 3 h, contadas após o alcance da temperatura desejada. Passado o tempo de análise, a mufla foi desligada e esperou-se até que a temperatura da mesma atingir 200 °C para que os cadinhos fossem retirados e colocados em um dessecador. Após o resfriamento dos cadinhos, suas massas foram aferidas e o cálculo do teor de cinzas foi calculado com base na seguinte equação (8):

$$\frac{MRAC - MR}{MA} \times 100\% = TC\% \quad (8)$$

Onde:

MRAC= Massa do conjunto recipiente/amostra calcinada

MR= Massa do recipiente

MA= Massa de cada amostra;

4.5.1.5 Determinação do teor de extrativos

Para a determinação do teor de extrativos a análise foi feita em um aparelho para extração por Soxhlet. Foi pesado aproximadamente 3 g de cada amostra e ela foi colocada dentro de um cartucho de papel de filtro previamente seco, pesado e identificado e colocado dentro do Soxhlet. Foi colocado 350 mL de etanol, ao sistema extrator e algumas pérolas de vidro, para evitar o superaquecimento. O teor de extrativos foi calculado baseando-se na equação (9)

$$TE\% = \frac{MRE - MRRS}{MA} \times 100\% \quad (9)$$

Tal que:

TE= Teor de extrativos

MRE= Massa do conjunto recipiente/extrativos

MRRS= Massa do conjunto recipiente/resíduo do solvente

MA= Massa de cada amostra

4.5.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A temperatura de degradação térmica foi avaliada através de um equipamento STA 6000 da PERKIN ELMER®. Todas as medidas foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de gás de 40 mL/min., aquecidas na faixa de 50-800 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, com massa seca das amostras de aproximadamente 7 mg.

4.5.3 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR foi realizado em equipamento da Perkin Elmer® modelo spectrum two. As amostras foram moídas e compactadas com Brometo de Potássio (KBr) (5%, m/m). O intervalo analisado foi entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} usando transformada de Fourier, com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

4.5.4 Colorimetria

A colorimetria foi realizada em equipamento Konica Minolta® tipo Spectrophotometer CM-5. As amostras foram lidas utilizando os parâmetros L^* , a^* e b^* , visando avaliar a cromaticidade das fibras.

4.5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de MEV foram realizadas com objetivo de visualizar a morfologia da superfície das amostras. O equipamento utilizado foi um microscópio eletrônico de varredura da Carl Zeiss, utilizando uma aceleração de voltagem de 15 kV. Antes da análise as amostras foram metalizadas com ouro utilizando um metalizador Emitech K550.

4.6 Imobilização por ligação covalente da lipase na fibra tratada/funcionalizada

As fibras F4,5 e FLF foram testadas como suporte para imobilização de lipase B de *Candida antarctica* (CALB) da Novozymes, código LCN 02128. As soluções de CALB foram preparadas em tampão fosfato de sódio 50mM em pH 7 e em tampão bicarbonato de sódio 200mM em pH 10, de forma a apresentar atividade inicial média de 9785 U/L e 9257 U/L, e teor de proteína 0,542 e 0,388 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A imobilização ocorreu nos tempos de 2h e 24h de contato. A imobilização foi realizada numa proporção de 0,3g de suporte para 10mL de solução, em incubadora shaker (Tecno®, TE-420), com velocidade de 70 rpm e temperatura ambiente (23°C). Visando a redução das bases de Schiff, após o tempo decorrido de imobilização o sistema contendo o sobrenadante juntamente com o derivado passou

por uma etapa de redução com borohidreto de sódio (10mg/mL) durante 30 min. Ao fim da reação o sobrenadante foi separado e o derivado foi lavado com tampão fosfato de sódio 50mM pH 7 e submetido à secagem a vácuo durante 15 min. Amostra de sobrenadante e derivado foram coletadas para determinação da atividade e teor de proteína. A imobilização ocorreu em triplicata, bem como as leituras de cada amostra.

4.6.1 Atividade hidrolítica em p-Nitrofenil Laurato

A hidrólise de p-nitrofenil laurato (pNFL) foi estabelecida para medir a atividade hidrolítica da enzima utilizada neste trabalho. Desta forma, utilizou-se uma solução de pNFL 560µM feita em tampão fosfato de sódio 50mM e pH 7 (AMARAL *et al.*, 2006). Foram pesados 0,018g de pNFL e essa massa foi diluída em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), e em seguida o conjunto pNFL e DMSO foi diluído em 99 mL de tampão fosfato de sódio 50mM. Esse substrato foi utilizado tanto para enzima livre quanto para enzima imobilizada. Para atividade da enzima livre, 3,6mL do substrato foram acondicionados em tubos de ensaio mantidos em banho de 37°C, em seguida 0,4mL de enzima livre foram adicionados aos tubos e as amostras foram lidas em cubeta de vidro em um comprimento de onda de 410nm, no modo cinético em espectrofotômetro Cary® tipo 50 Conc. Para leitura do branco, foi utilizado apenas a amostra de substrato. O cálculo da atividade foi realizado através da equação (3):

$$A = \frac{\Delta Abs * D * f * V_R}{\Delta t * V_A} \quad (3)$$

Sendo:

A – Atividade da enzima (U/L), onde U é definido como a quantidade de enzima que libera 1µmol de p-nitrofenol por minuto;

ΔAbs – Variação de absorbância em Δt (min), durante a fase do aumento linear de absorbância;

D- Diluição realizada;

f – Fator de conversão da cubeta para o espectrofotômetro utilizado;

Δt – Tempo decorrido de análise, em minutos;

V_A – Volume (L) de solução enzimática utilizado;

V_R – Volume (L) do meio reacional.

Para atividade da enzima imobilizada, foram adicionados 30mL de substrato a um béquer encamisado, com agitação magnética e mantido a 37°C. A essa solução foram adicionados 50mg do suporte com enzima imobilizada e durante 10 min foram feitas o maior número de leituras possível do meio reacional, em comprimento de onda de 410nm. Para o cálculo da enzima imobilizada utilizou-se a fórmula (4):

$$A = \frac{\Delta Abs * D * f * V_R}{\Delta t * M_A} \quad (4)$$

A – Atividade da enzima (U/kg), onde U é definido como a quantidade de enzima que libera 1µmol de p-nitrofenol por minuto;

ΔAbs – Variação de absorbância em Δt (min), durante a fase do aumento linear de absorbância;

D- Diluição realizada;

f – Fator de conversão da cubeta para o espectrofotômetro utilizado;

Δt – Tempo decorrido de análise, em minutos;

M_A – Massa (kg) de enzima imobilizada utilizada;

V_R – Volume (L) do meio reacional.

4.6.2 Teor de proteína

A determinação do teor de proteína foi feita de acordo com Bradford (1976). A preparação do reagente de Bradford deu-se a partir da dissolução de 100mg de azul de Comassie em 50mL de etanol 95% e posteriormente foram adicionados 100mL de ácido orto-fosfórico 85% (m/v), a solução final foi aferida para 1L com água destilada. Em um tubo de ensaio foram colocados 3mL de solução e 0,3mL de amostra e após 3 minutos de reação a amostra foi lida em espectrofotômetro tipo Cary® tipo 50 Conc. em comprimento de onda de 595nm. Os valores de absorbância obtidos foram correlacionados com os valores de absorbância de uma curva de calibração feita com solução de albumina bovina concentração conhecida dentro da faixa de 0 a 10µg de proteína/mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Pré-tratamento das fibras

Esta etapa visou proporcionar maior exposição dos grupamentos hidroxila presentes na estrutura da celulose para posterior funcionalização, contudo, sem remoção completa da lignina já que a presença dessa pode conferir ao suporte maior resistência e proteção contra agentes microbiológicos (YOO *et al.*, 2020).

5.1.1 Composição química das fibras

A tabela 3 mostra os dados de composição das fibras tratadas com peróxido de hidrogênio em comparação aos dados da fibra bruta (FCCV).

Tabela 3. Composição química da FCCV e das fibras tratadas com peróxido de hidrogênio com concentrações de 4,5%, 5,5%, 6,5% e 7,5% a 50°C, pH 11,5 por 2h.

Amostra	Hemicelulose (%)	Alfacelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)
FCCV	32,6	26,9 ^b	30,4 ^a	4,53	15,2
F4,5	28,2	42,1 ^a	23,3 ^b	1,94	2,61
F5,5	34,4	41,0 ^a	19,9 ^c	N.D.	N.D.
F6,5	26,8	43,3 ^a	21,0 ^{bc}	N.D.	N.D.
F7,5	31,9	39,6 ^a	18,8 ^c	N.D.	N.D.

N.D. : Não determinado pelo autor

As letras a, b e c indicam diferenças significativas a um nível de confiança de 95%, pelo teste T.

Fonte: Elaborado pela autora.

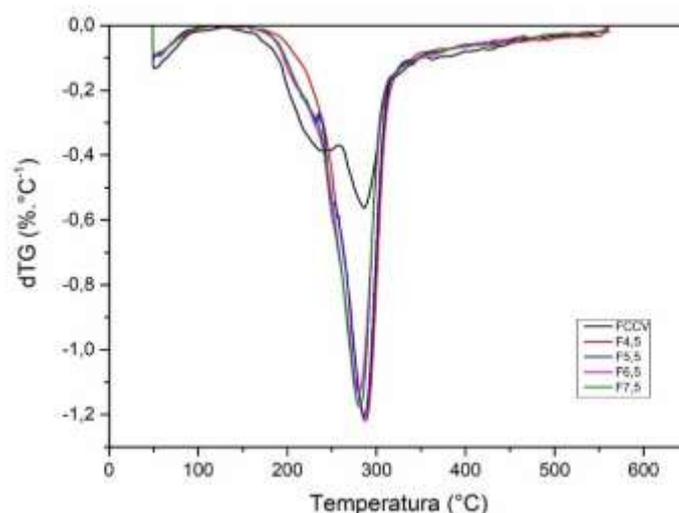
Neste trabalho adotou-se um pH de 11,5, que tem se mostrado um pH ideal para a deslignificação dos materiais lignocelulósicos (BANERJEE *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2016; GOULD, 1984; RABELO *et al.*, 2008). Brígida *et al.* (2010) trabalharam com pH 8,6, concentração de peróxido de 4,5% (m/v) e T=85°C, e não houve redução no teor de lignina. Além de menor temperatura, a reação neste trabalho conduzida a pH11,5, mostrou considerável redução no teor de lignina e aumento significativo no teor de celulose, o que pode favorecer a exposição dos grupamentos hidroxila durante a etapa de funcionalização. É possível notar que a diferença entre o tratamento de menor concentração e o de maior concentração, foi pouca em relação a remoção de

lignina e igual em relação ao teor de celulose. Vemos também que na tabela 4 é apresentado a caracterização química completa das fibras F4,5 e FCCV. Também podemos perceber que também houve considerável redução no teor de extrativos e de cinzas. Desta forma, ao compararmos com o trabalho de Brígida *et al* (2010), a estratégia de trabalhar com pH 11,5 se mostrou bastante efetiva para remoção de lignina e manutenção da celulose. O que é confirmado por Galbe & Wallberg (2019), quando eles afirmam que em pH mais alcalino o resultado é a dissolução da lignina, enquanto algumas hemiceluloses não são dissolvidas totalmente. Além da remoção da lignina, também são removidos agentes como sais, ácidos fenólicos e furfural (SILVA *et al.*, 2013).

5.1.2 Análise termogravimétrica

As fibras foram analisadas por termogravimetria visando avaliar a influência dos tratamentos na estabilidade térmica das mesmas, os dados são mostrados na figura 11 e na tabela 4. Na Figura 11 é possível observar que há um primeiro pico referente a perda de umidade, em todas as amostras, em temperatura próxima a 100°C. Na FCCV o segundo pico ocorre próximo a 235°C que é referente a decomposição de componentes amorfos como as hemiceluloses e outros constituintes de rápida degradação como os extrativos (GUIMARÃES *et al.*, 2009; MORÁN *et al.*, 2008). E para as demais fibras o segundo pico ocorre em temperatura próxima a do terceiro da FCCV, que é em torno de 280°C que, de acordo com Souza *et al.* (2016), é referente a decomposição das cadeias glicosídicas presentes na celulose. A lignina se decompõe em uma faixa de temperatura entre 200 e 500°C, o que provavelmente refletiu numa sobreposição de picos e não foi possível distinguir o pico referente a temperatura máxima de degradação da lignina.

Figura 11. Curvas de dTG para FCCV, F4,5, F5,5, F6,5 e F7,5



Fonte: Elaborado pela autora.

Brígida *et al.* (2010) partiram de uma fibra com Tonset próxima a 268°C e após o tratamento ela ficou com temperatura inicial de degradação de aproximadamente 274,1°C. Esses valores são superiores aos das amostras FCCV e F4,5, no entanto, isso se deve ao fato de que a fibra do trabalho citado tinha um maior teor de lignina e com isso o valor de sua estabilidade térmica se torna maior. Desta forma, com base na diferença de Tonset de fibra bruta e tratada, a melhoria da estabilidade térmica obtida por Brígida *et al.* (2010) foi menor que a obtida neste trabalho.

A fibra que apresentou melhor estabilidade térmica foi a F4,5, e isso é justificado pelo fato de ela ter o maior percentual de lignina em sua composição. Pode-se observar também que de acordo com a tabela 4 o teor de massa residual foi maior para a FCCV, isso foi corroborado pela caracterização química que mostrou elevado teor de cinzas para esse material. Tudo isso contribui para a confirmação na eficiência no pré-tratamento da F4,5, mostrando que foi possível remover alguns componentes da fibra sem causar danos a celulose ou a sua estabilidade térmica.

Tabela 4. Dados de termogravimetria para FCCV, F4,5, F5,5, F6,5 e F7,5

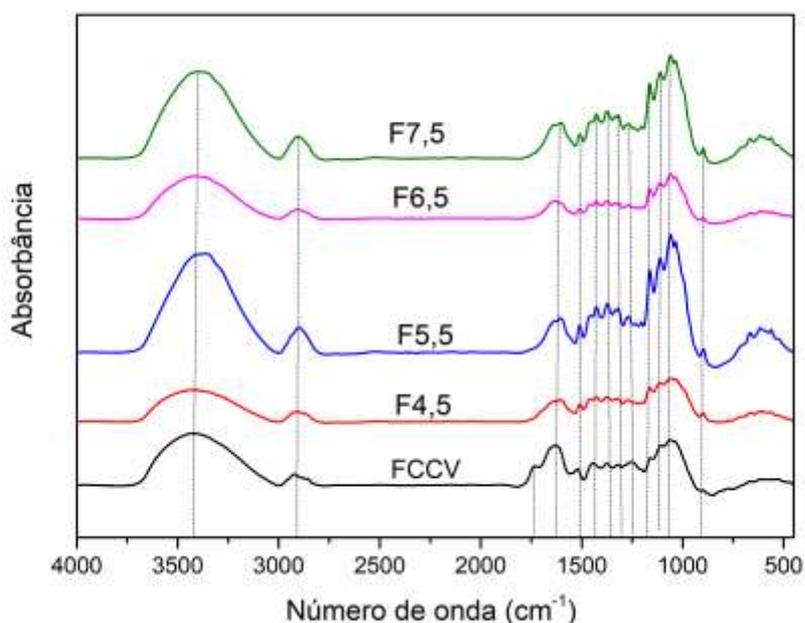
AMOSTRAS	Tonset (°C)	1° Evento (°C)	2° Evento (°C)	Massa residual (%)
FCCV	219	235	285	34,5
F4,5	261	291	-	23,1
F5,5	246	283	-	23,2
F6,5	248	280	-	24,1
F7,5	241	285	-	24,9

Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Espectros de FTIR da FCCV e das fibras tratadas são mostrados na Figura 12. Todos os espectros revelam uma banda intensa em torno de 3371 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento das ligações tipo –OH presentes na celulose e na lignina (GONÇALVES *et al.*, 2014). Bandas em torno de 1370, 1425 e 2900 cm^{-1} podem ser associadas a presença de ligações tipo CH características de materiais lignocelulósicos (NASCIMENTO *et al.*, 2016). Foi possível perceber uma banda em torno de 1745 cm^{-1} referente a C=O presente em ésteres, hemiceluloses e ácidos fenólicos de extrativos (SOUZA *et al.*, 2016) que apareceu somente no espectro da FCCV, isso mostra a eficiência dos tratamentos em relação a remoção da maior parte desses componentes das fibras tratadas, corroborando com a análise química e os resultados de TGA. Entretanto é possível perceber que as hemiceluloses não foram removidas completamente através do aparecimento da banda em torno de 1163 cm^{-1} em todas as amostras, o que pode ser confirmado, mais uma vez, pela caracterização química. Todas elas também apresentaram as bandas referentes aos anéis aromáticos da lignina em torno de 1605 e 1511 cm^{-1} e a presença de bandas em torno de 1267 e 1116 cm^{-1} referentes a vibração do anel guaiacila e a deformação angular do C-H dos anéis de guaiacila e siringila, respectivamente, comprovando a presença de lignina nas amostras. A presença da celulose também pode ser confirmada pelas bandas referentes aos anéis glucosídicos em torno de 1060 e 890 cm^{-1} (NASCIMENTO *et al.*, 2016).

Figura 12. Espectros de FTIR para FCCV, F4,5, F5,5, F6,5 e F7,5



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Funcionalização da fibra de coco

A funcionalização visou tornar a fibra capaz de formar ligação covalente com a enzima. Duas alternativas para a inserção de grupos funcionais foram avaliadas: a) oxidação dos grupamentos hidroxila vicinais presentes na celulose utilizando periodato de sódio e conseqüentemente promovendo a formação de grupamentos aldeídos; b) reação de substituição com o cloreto de p-toluenossulfonila, onde o grupamento tosil se liga diretamente a hidroxila e na presença da enzima atua como grupo abandonador sendo substituído pela mesma.

5.2.1 Funcionalização utilizando periodato de sódio

Para a funcionalização da fibra de coco oxidada com peróxido de hidrogênio e fibra apenas lavada com água, avaliou-se o efeito de duas variáveis independentes (proporção m:v; tempo de reação) na quantidade de grupos aldeídos obtidos por grama de suporte (Tabela 5) após a funcionalização.

Tabela 5. Valores referentes a formação de grupos aldeído em μmol para 1g de suporte.

Teste	Proporção (m/v)	Tempo (min)	Grupos aldeído ($\mu\text{mol/g}$ de suporte)
1	1:20	30	198,61 ^a
2	1:20	60	198,62 ^a
3	1:20	90	198,63 ^a
4	1:20	120	198,67 ^a
5	1:30	30	197,75 ^c
6	1:30	60	197,95 ^b
7	1:30	90	197,96 ^b
8	1:30	120	198,02 ^b

As letras a, b e c indicam diferenças significativas a um nível de confiança de 95%, pelo teste T
 Fonte: Elaborado pela autora.

Brígida *et al.* (2006), que trabalharam com fibra de coco funcionalizada com GPTMS e oxidada com periodato, conseguiram um grau de ativação 132,74 μmol de grupos aldeído para cada grama de suporte, utilizando 40mM de periodato em 1h de reação. Já Nikolic *et al.* (2010), que utilizou algodão como suporte, trabalhou em uma proporção 1:50 (m/v) e conseguiram uma quantidade máxima de grupos aldeído de 100 $\mu\text{mol/g}$, mesmo após 350 minutos de reação utilizando um concentração de periodato de sódio de 1,8mM. Ambos os valores citados são inferiores ao obtido neste trabalho. É válido ressaltar que Nikolic *et al.* (2010), trabalharam com uma concentração inferior de reagente, o que pode ter interferido no processo oxidativo, mesmo ele utilizando maior volume de reagente e tempo de reação.

De acordo com Tardioli (2003), uma maior densidade de grupos aldeído torna maior a possibilidade de interação entre a enzima e o suporte. Dentre as fibras testadas com periodato de sódio, a condição que proporcionou um maior número de grupamentos aldeído foi a de 30 min de reação numa proporção 1:20 (m/v), condição que demandou menor tempo de reação e menor gasto de reagente. Essa condição quando aplicada a fibra lavada mostrou um grau de ativação de 198,38 $\mu\text{mol/g}$ de suporte, o que também pode ser considerado adequado para imobilização enzimática. Sendo assim, o aumento da área superficial da fibra, através da maior remoção da lignina, provocou uma maior exposição dos grupamentos hidroxila presentes na fibra e com isso uma maior oxidação para a FF. E em relação a FLF é possível concluir que

a lavagem da fibra apenas com água foi capaz de expor parte dos grupamentos hidroxila presentes na celulose. Ambas as fibras podem ser utilizadas como suportes, no entanto, a aplicação irá ser diferenciada. Será possível aplicar a FF em reações que demandem um produto mais limpo, como na clarificação de suco de maçã (BEZERRA *et al.*, 2014), enquanto a FLF poderá ser destinada a produtos como resíduos gerados a partir de óleo de cozinha ou águas residuais, entre outros (AGUIAR *et al.*, 2005; FACANALI *et al.*, 2017).

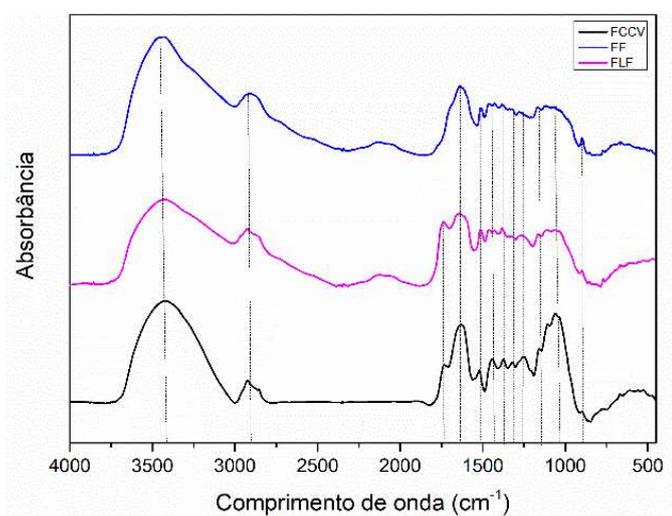
5.2.1.1 Determinação do teor de extrativos

A determinação do teor de extrativos para as fibras pré-tratadas e posteriormente funcionalizadas com periodato de sódio (FF) mostrou um percentual de 0,8% no total. Uma diminuição considerável em relação a fibra pré-tratada antes da etapa de funcionalização (2,6%). De acordo com Taherzadeh & Karimi (2007), parte dos extrativos pode ser solubilizada em água, desta forma a lavagem com água feita após a funcionalização, pode ter ocasionado a diminuição do teor de extrativos.

5.2.1.2 Espectroscopia no infravermelho com Transformada em Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das fibras oxidadas, em comparação a FCCV, são mostrados na figura 13.

Figura 13. Espectros de FTIR para FCCV, FF e FLF



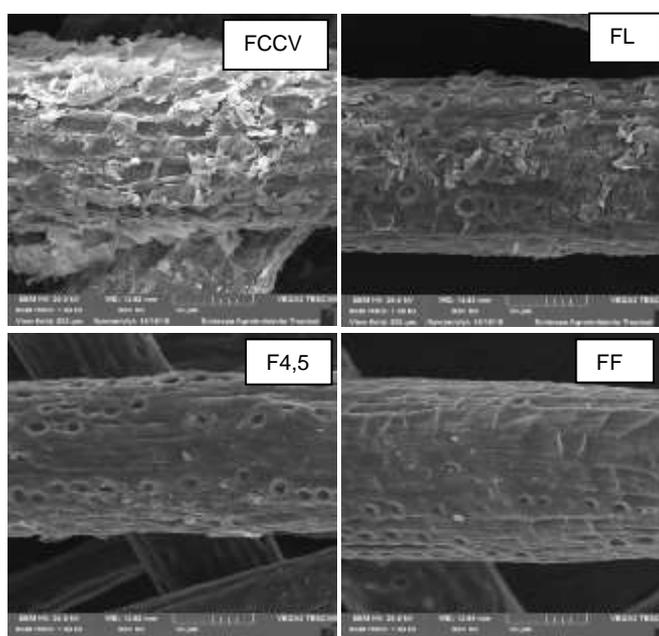
Fonte: Elaborado pela autora.

A banda em torno de 1730 cm^{-1} é referente aos grupamentos C=O dos ésteres e ácidos fenólicos constituintes de extrativos e hemiceluloses e nas fibras funcionalizadas também pode ser associada a presença dos grupamentos aldeído formados após a oxidação. A absorção em 1377 cm^{-1} indica a existência de ligações tipo C-H presentes nas hemiceluloses e na celulose, o que comprova que não houve remoção total das hemiceluloses após as etapas de pré-tratamento. As bandas na região de 1450 cm^{-1} mostram a existência dos grupamentos -CHO dos aldeídos. De modo geral, a presença de bandas referentes à estrutura dos aldeídos mostraram que os tratamentos promoveram uma funcionalização efetiva nas fibras (SOCRATES, 2001).

5.2.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O efeito da remoção dos macrocomponentes das fibras, causado pelos tratamentos, foi visualizada pelo MEV (Figura 14).

Figura 14. Imagens com aumento de 500x que mostram o efeito da remoção dos macrocomponentes na FL, F4,5 e FF em comparação a FCCV.



Fonte: Elaborado pela autora.

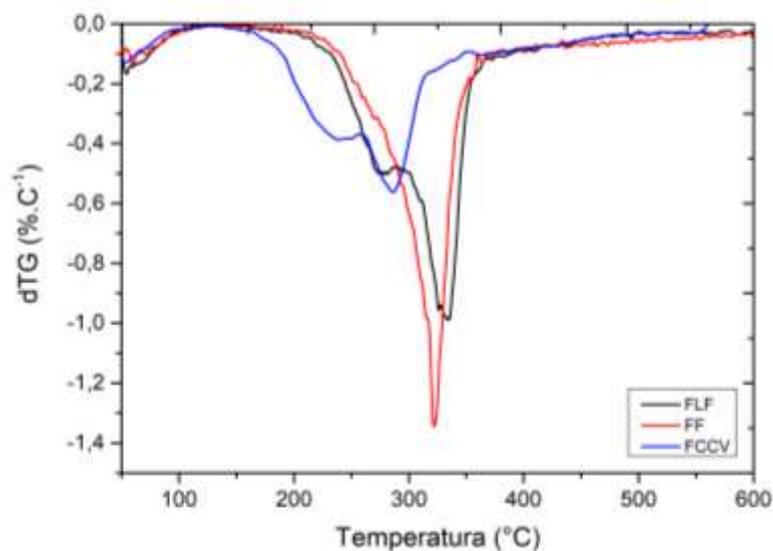
A superfície da FCCV é desnivelada e heterogênea devido a distribuição irregular de ceras e ácidos graxos, essa heterogeneidade também foi observada por

Brígida *et al.* (2010). Foi possível perceber na FL, apesar da lavagem com água ter removido parte das ceras e dos ácidos graxos, ainda existem resíduos desse material e a fibra ainda se mostra parcialmente irregular. Após o tratamento alcalino, é possível observar que a F4,5 se apresentou mais uniforme devido a remoção de parte da lignina, ceras e ácidos graxos presentes na superfície da superfície, corroborando com a caracterização química das amostras (Tabela 3) (Souza *et al.*, 2016). É possível notar que a superfície da fibra após a funcionalização se mostra mais lisa e homogênea, o que corrobora com a análise de extrativos que mostrou uma diminuição no percentual do mesmo. O que pode ser considerado vantajoso para aplicações em que haja necessidade de um suporte mais limpo e sem formação de coprodutos.

5.2.1.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A figura 15 nos mostra as curvas de dTG para as amostras que foram funcionalizadas em comparação a fibra ainda bruta.

Figura 15. Curvas de dTG para FCCV, FF e FLF



Fonte: Elaborado pela autora.

É possível perceber que houve um aumento na estabilidade térmica de ambas as fibras após a etapa de funcionalização. A FF e a FLF passaram a apresentar Tonset com valores muito próximos, 252 e 249°C, respectivamente. Ao compararmos com a FCCV vemos que ambos os suportes, mesmo após a etapa de funcionalização,

ainda permanecem com estabilidade térmica mais elevada que a fibra *in natura*, 219°C. O ombro que aparece em torno de 270°C na FLF indica a presença de hemiceluloses, ceras e ácidos graxos e isso já era esperado pois esta amostra foi lavada apenas com água (SOUZA *et al.*, 2016). O que corrobora com a análise de MEV que mostra frações de ceras ainda na superfície da fibra após a lavagem apenas com água. Sendo assim, através dessas análises foi possível confirmar a estabilidade térmica do material apresentado.

5.2.2 Funcionalização utilizando o cloreto de p-toluenossulfonila

Na funcionalização com o cloreto de p-toluenossulfonila avaliou-se o efeito do tempo, da concentração do reagente funcionalizante e da presença de duas bases no meio reacional. As amostras de F4,5 e FL que foram tratadas com cloreto de p-toluenossulfonila foram caracterizadas por MEV-EDS e na escolha do solvente foi utilizado o software SimaPro.

Para que o efeito da funcionalização fosse estudado as amostras de FL e F4,5 também foram submetidas a análise de MEV-EDS. A tabela 6 nos mostra os valores obtidos para o teor de enxofre em cada amostra, sendo T1, T2 e T3 as siglas equivalentes aos testes citados no tópico 4.5.2.

Tabela 6. Valores percentuais de enxofre, obtidos por MEV-EDS, para as amostras F4,5 e FL, que foram submetidas aos testes com cloreto de p-toluenossulfonila.

Amostra	F4,5	F4,5 T1	F4,5 T2	F4,5 T3	FL	FL T1	FL T2
Teor de enxofre (%)	0	22	6,5	17	0	13	0,5

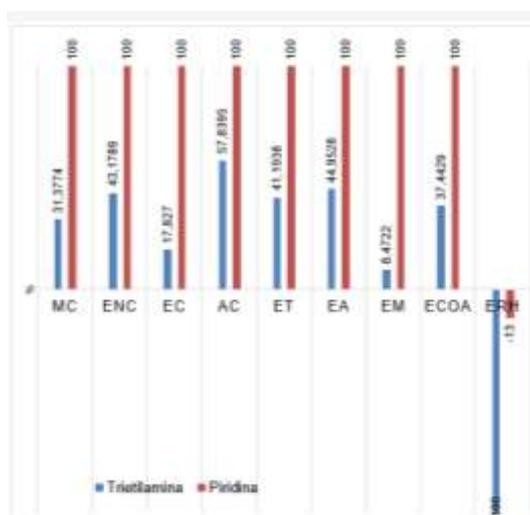
Fonte: Elaborado pela autora.

Esta tabela nos mostra que as fibras antes dos tratamentos não possuíam enxofre em sua superfície, e logo após os testes com o cloreto de p-toluenossulfonila as fibras mostraram um determinado percentual de enxofre. Isso comprova a incorporação do grupamento na estrutura da fibra e mostra a eficiência dos testes para funcionalização. É possível observar também que a trietilamina conseguiu incorporar um teor maior de enxofre na superfície das fibras. As fibras tratadas com peróxido de hidrogênio, obtiveram um maior teor de enxofre que as fibras que foram apenas lavadas com água. Isso deve-se ao fato da maior exposição dos grupamentos

hidroxila presentes na celulose da fibra, o que torna a fibra mais reativa. Os dados foram obtidos através valores médios oriundos de varreduras feitas em determinados pontos da fibra, com isso essas médias podem não ser absolutas, serão necessários testes posteriores para confirmação das mesmas. El-sayed *et al.* (2018), trabalharam com tosilção de celulose microcristalina e através da caracterização por energia dispersiva conseguiram mostrar que obtiveram um teor de enxofre de 6,31%, utilizando 0,208M de concentração, tempo de 24h e utilizando dimetilacetamida como base. Neste trabalho, o maior valor obtido foi de 22% para a reação utilizando trietilamina como base, durante 21h e concentração de 0,28M de cloreto de p-toluenosulfonila. Para as amostras do teste 2, também foi possível obter valores elevados de enxofre, mesmo em um tempo inferior devido a maior concentração de reagente utilizada e a mudança de base. Desta forma, verifica-se que há influência no tempo de reação, na concentração de reagente e também na base utilizada no meio reacional. Sendo a trietilamina a base que proporcionou maior funcionalização entre os testes realizados.

Além disso, através do software SimaPro foi estudado o impacto ambiental causado por ambos os reagentes utilizados no processo, a Piridina e a Trietilamina, ambos reportados em reações de funcionalização com o cloreto de p-tolueonossulfonila (ALBAYRAK & YANG, 2002; RAHMAN *et al.*, 2016). A figura 16 mostra o gráfico gerado pelo SimaPRO, com os valores referentes aos critérios avaliados.

Figura 16. Valores obtidos através do programa SimaPro para comparação entre a produção de 1kg de trietilamina e 1kg de piridina.



Fonte: Elaborado pela autora.

Através desta figura é possível perceber que em todos os cenários a piridina apresenta impacto ambiental negativo maior que a trietilamina. Desta forma, a trietilamina, além de ter sido mais eficiente na funcionalização, é a de menor impacto, sendo a melhor alternativa para dar continuidade aos testes com este método de funcionalização.

5.3 Teste de estabilidade do suporte

Visando avaliar o efeito de diferentes condições reacionais em cada tipo de fibra obtido, fez-se necessário alguns testes com amostras de FCCV, F4,5 e FF variando os meios e as temperaturas.

5.3.1 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada em Fourier

Os espectros de FTIR das fibras após os testes de estabilidade mostraram que a composição da fibra se manteve estável. As amostras foram nomeadas de acordo com o meio reacional:

TP5- Amostras que estiveram em tampão pH 5

TP7- Amostras que estiveram em tampão pH 7

TP9- Amostras que estiveram em tampão pH 9

ET - Amostras que estiveram em etanol

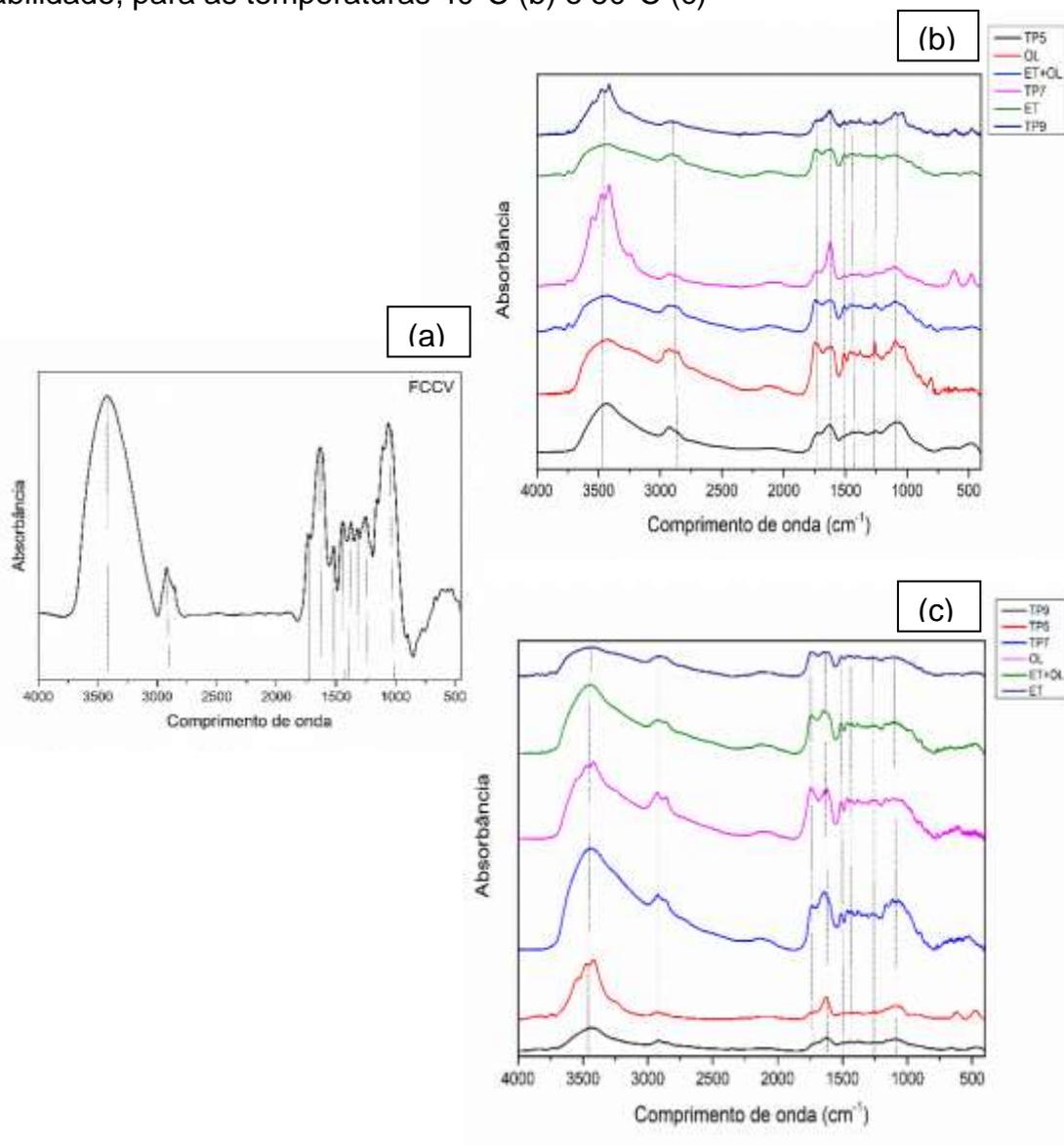
OL - Amostras que estiveram em óleo

ET+OL - Amostras que estiveram em etanol+óleo

A figura 17 nos mostra os espectros das amostras de FCCV que foram testadas a 40 e 50°C. Os espectros para a F4,5 e FF, são mostrados nas figuras 18 e 19. É possível notar que as principais bandas atribuídas a materiais lignocelulósicos apresentam-se no espectro, mesmo com a variação dos meios reacionais e da temperatura. As bandas em torno de 3400cm^{-1} que são atribuídas aos grupamentos hidroxila e as bandas em torno de 2900cm^{-1} que são características dos grupamentos metil e metileno. As vibrações aromáticas da lignina são evidenciadas por bandas na faixa de 1604cm^{-1} . A absorção em 1700cm^{-1} , indica a presença de extrativos e ácidos graxos. Algumas amostras de F4,5 e FF, mesmo tendo passado por tratamentos para remoção dos extrativos e das hemiceluloses, ainda apresentam bandas em torno de

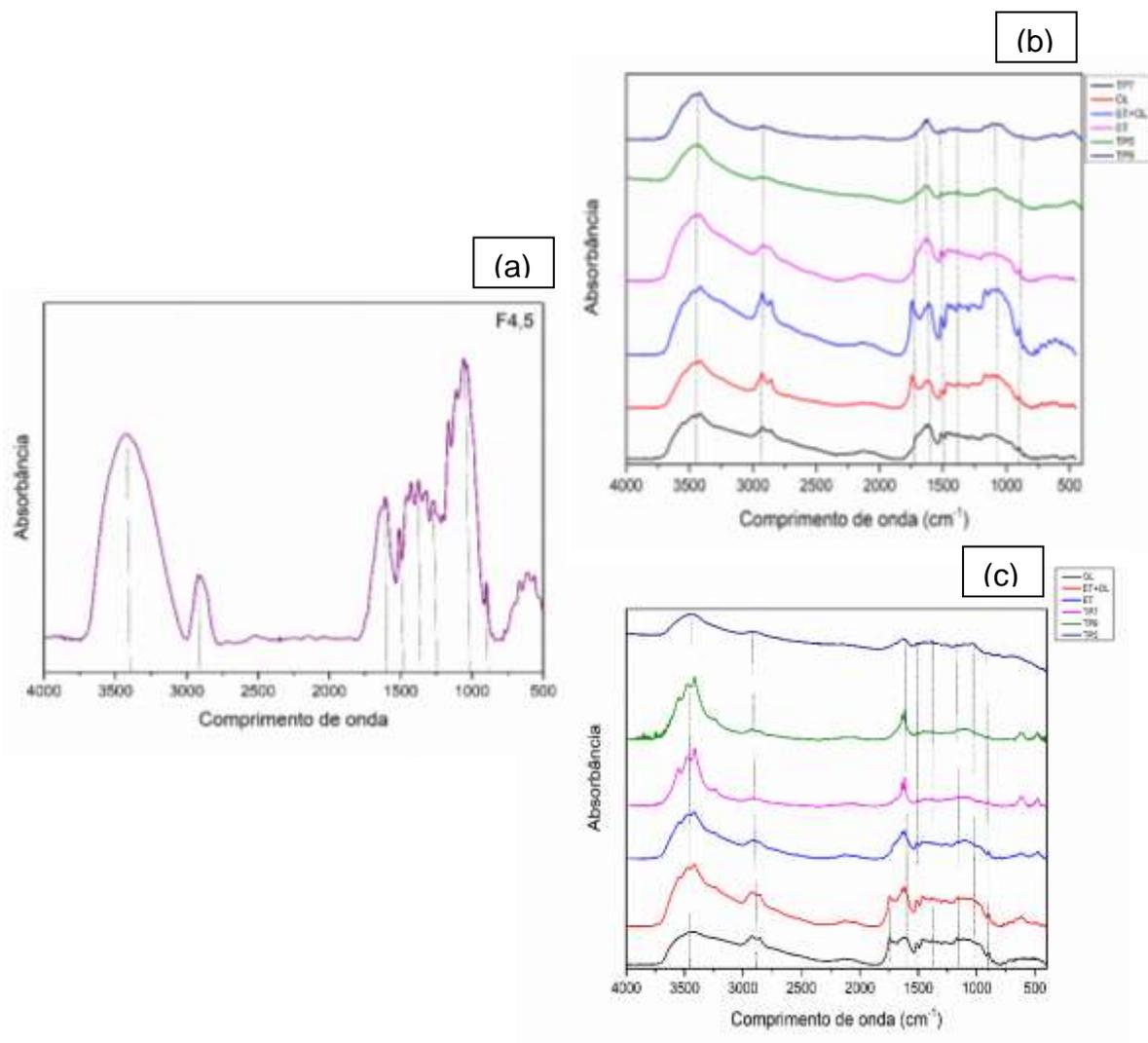
1700 cm^{-1} , no entanto essas bandas podem ser associadas à presença de óleo residual na superfície da fibra.

Figura 17. Espectros de FTIR para as FCCV antes (a) e depois do teste de estabilidade, para as temperaturas 40°C (b) e 50°C (c)



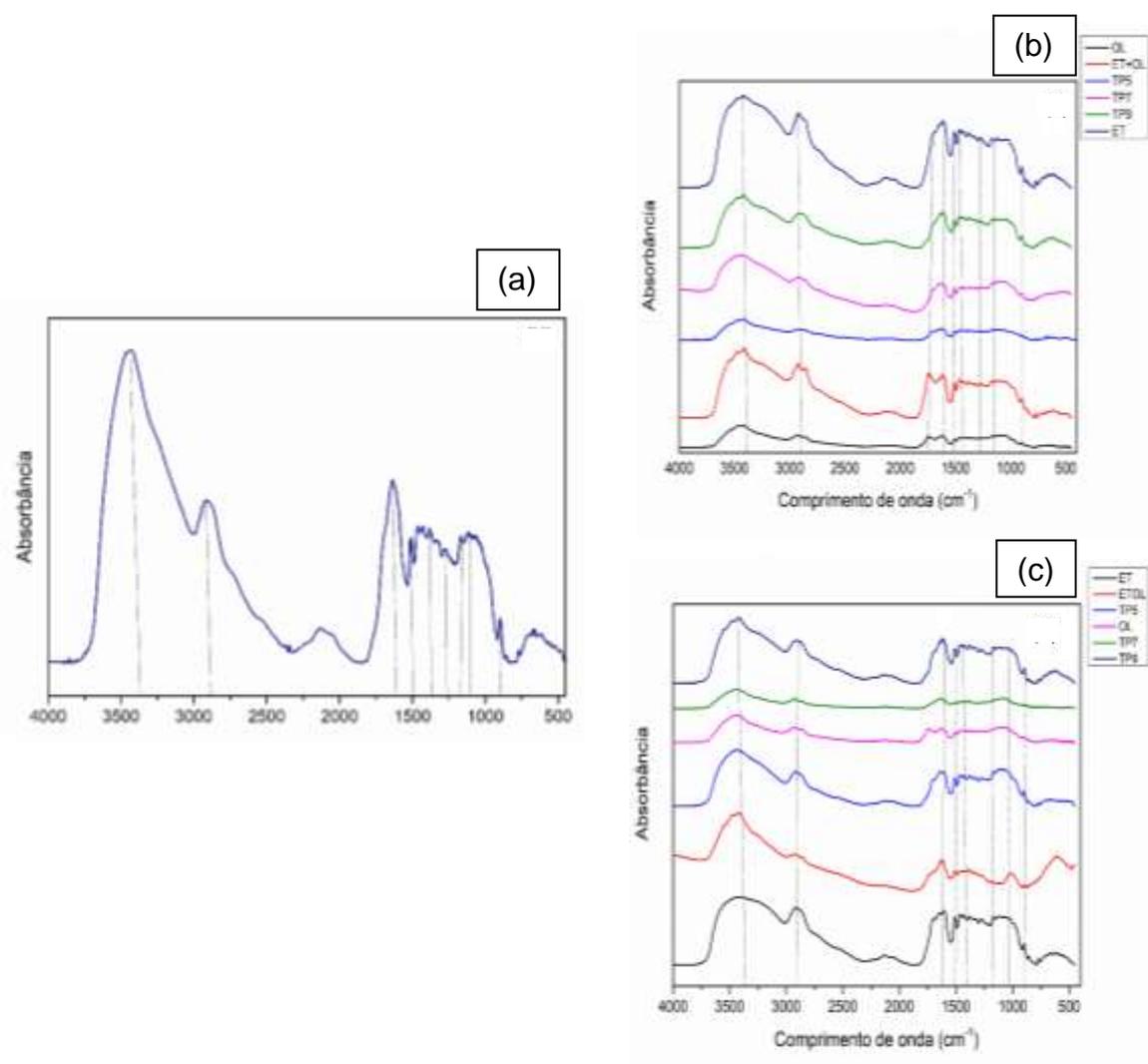
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 18. Espectros de FTIR para amostras de F4,5 antes (a) e depois de passarem pelo teste dos meios reacionais, para as temperaturas 40°C (b) e 50°C (c)



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 19. Espectros de FTIR para as amostras de FF antes (a) e depois de passarem pelo teste dos meios reacionais, para as temperaturas 40°C (b) e 50°C (c)



Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.2 Análise termogravimétrica (TGA)

Os valores referentes aos dados de termogravimetria das fibras após os testes com os meios reacionais, citados no tópico anterior, são comparados com as fibras antes dos tratamentos e mostrados nas tabelas 7,8 e 9.

Tabela 7. Dados de termogravimetria para as amostras de FCCV antes e depois dos testes de estabilidade nas temperaturas de 40°C e 50°C.

AMOSTRAS	Tonset (°C)	1° Evento (°C)	2° Evento (°C)	Massa residual (%)
FCCV	219	235	285	34,5
TESTE EM 40°C				
TP7	252	288	332	27,9
TP9	250	292	333	28,3
TP5	266	286	367	23,1
ET	255	293	362	19,8
OL	261	291	362	17,9
ET+OL	258	292	364	18,0
TESTE EM 50°C				
TP7	252	280	326	28,5
TP9	257	290	339	25,9
TP5	265	316	354	28,7
ET	265	295	365	17,3
OL	261	288	363	18,7
ET+OL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. : Não determinado pelo autor

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 8. Dados de termogravimetria para as amostras de F4,5 antes e depois dos testes de estabilidade nas temperaturas de 40°C e 50°C.

AMOSTRAS	Tonset (°C)	1° Evento (°C)	2° Evento (°C)	Massa residual (%)
F4,5	261	291	-	23,1
TESTE EM 40°C				
TP7 40	260	320	-	25,2
TP9 40	252	325	-	28,7
TP5 40	255	326	-	27,7
ET 40	258	315	-	25,7
OL 40	274	326	-	18,8
ET+OL	265	319	-	21,5

Continua

Tabela 8. Dados de termogravimetria para as amostras de F4,5 antes e depois dos testes de estabilidade nas temperaturas de 40°C e 50°C.

AMOSTRAS	Tonset (°C)	1° Evento (°C)	2° Evento (°C)	Massa residual (%)
TESTE EM 50°C				
TP7 40	247	315	-	25,3
TP9 40	255	311	-	28,5
TP5 40	260	330	-	29,8
ET 40	257	314	-	25,2
OL 40	264	320	-	24,2
ET+OL	265	319	-	23,8

Conclusão

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 9. Dados de termogravimetria para as amostras de FF antes e depois dos testes de estabilidade nas temperaturas de 40°C e 50°C.

AMOSTRAS	Tonset (°C)	1° Evento (°C)	2° Evento (°C)	Massa residual (%)
FF	252	322	-	27,6
TESTE EM 40°C				
TP7 40	253	290	-	27,6
TP9 40	257	317	-	33,3
TP5 40	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ET 40	248	298	-	23,9
OL 40	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ET+OL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TESTE EM 50°C				
TP7 40	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TP9 40	248	318	-	31,7
TP5 40	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ET 40	246	329	-	24,2
OL 40	260	316	-	27,9
ET+OL	247	319	-	26,5

N.D. : Não determinado pelo autor

Fonte: Elaborado pela autora

Através destas tabelas vemos que após os testes houve um aumento da estabilidade térmica da fibra em relação a FCCV. Os extrativos, que são componentes de rápida degradação, são facilmente solubilizados nos meios testados, e com isso ocorre o aumento na estabilidade térmica das amostras de FCCV testadas. Já em relação a F4,5 e a FF, observa-se que há uma certa estabilidade em relação a variação das temperaturas de degradação das amostras, desta forma é possível

compreender que esses componentes facilmente solubilizados não aparecem com tanta intensidade nessas fibras e com isso a tendência é que os meios reacionais utilizados sejam minimamente contaminados. Desta forma, a utilização das fibras sem tratamentos somente será em casos onde os meios reacionais possam receber esse coproduto sem que haja interferência no produto final desejado, como é o caso de águas residuais oleosas ou resíduos gerados a partir de óleo de cozinha (MENDES *et al.*, 2005; DELGADO *et al.*, 2017).

5.3.3 Colorimetria

Os valores médios dos índices colorimétricos para as amostras de FCCV, F4,5 e FF podem ser vistos nas tabelas 10,11 e 12, respectivamente.

Tabela 10. Valores de L*, a* e b* para as amostras de FCCV após o teste de estabilidade, nas temperaturas de 40 e 50°C.

Amostra	T (°C)	L*	a*	b*	Amostra	T(°C)	L*	a*	b*
FCCV	-	47,5	9,64	24,2	FCCV	-	-	-	-
TP7	40	49,5	10,8	23,9	TP7	50	52,1	10,7	25,7
TP9	40	49,0	6,93	22,0	TP9	50	48,1	7,74	23,5
TP5	40	55,1	10,0	26,3	TP5	50	59,7	10,3	28,3
ET	40	51,8	9,00	22,9	ET	50	53,3	8,9	24,0
OL	40	48,8	8,79	23,6	OL	50	50,9	10,2	26,0
ET+OL	40	49,8	8,68	23,1	ET+OL	50	50,4	9,74	24,0

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 11. Valores referentes a L*, a* e b* para as amostras de F4,5 após o teste de estabilidade, nas temperaturas de 40 e 50°C.

Amostra	T (°C)	L*	a*	b*	Amostra	T(°C)	L*	a*	b*
F4,5	-	82,1	-2,79	23,5	F4,5	-	-	-	-
TP7	40	80,7	-1,73	16,2	TP7	50	75,3	0,21	18,8
TP9	40	81,4	-0,81	17,2	TP9	50	73,2	-0,05	18,0
TP5	40	82,9	-1,89	9,79	TP5	50	84,9	-0,92	15,2
ET	40	78,3	-3,86	20,4	ET	50	78,9	-0,43	25,5
OL	40	74,4	-3,09	21,8	OL	50	66,4	-1,26	15,5
ET+OL	40	77,2	-3,08	18,7	ET+OL	50	73,1	-1,12	18,7

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 12. Índices de colorimetria para as amostras de FF após os testes de estabilidade, nas temperaturas de 40 e 50°C.

Amostra	T (°C)	L*	a*	b*	Amostra	T(°C)	L*	a*	b*
FF	-	67,1	5,13	16,2	F4,5	-	-	-	-
TP7	40	60,8	4,25	19,9	TP7	50	57,4	5,37	21,9
TP9	40	55,6	4,98	20,8	TP9	50	58,0	4,62	21,3
TP5	40	63,3	4,00	20,6	TP5	50	66,3	7,23	26,9
ET	40	59,5	3,92	19,1	ET	50	55,8	3,30	20,0
OL	40	43,4	4,11	18,4	OL	50	56,2	3,82	22,2
ET+OL	40	43,7	4,04	17,6	ET+OL	50	62,6	3,53	21,1

Fonte: Elaborado pela autora

O aumento dos valores de L* apresentados na tabela 10 indica que houve remoção de agentes cromóforos presentes na FCCV após os testes de estabilidade. Os valores de a* e b* para a FCCV indicam que a sua tonalidade é laranja claro em todas as amostras. Entre as amostras de FCCV, a que sofreu maior variação de coloração mostrando as maiores alterações em L*, a* e b*, foi a TP5, nas duas temperaturas utilizadas. A segunda maior remoção ocorre no meio com etanol e isso pode ser atribuído a solubilização de ceras e extrativos, que em temperatura elevada se mostraram mais solúveis. Ao compararmos os valores da tabela 10 com os da tabela 9, vemos que houve uma grande variação para os índices de colorimetria em relação, isso se dá devido ao pré-tratamento que a F4,5 sofreu e com isso vários agentes cromóforos foram removidos antes dos testes de estabilidade. É possível perceber também que após o tratamento com óleo houve um maior escurecimento da F4,5 e FF, devido a deposição das micelas de óleo residual na superfície da amostra, o que corrobora com as análises de FTIR que mostram bandas características gorduras. O tampão em pH 5 também se destacou para a F4,5 pois ele mais uma vez promoveu maior alteração de cor na amostra. Desta forma, foi possível notar que a temperatura mais elevada promoveu maior remoção dos agentes cromóforos na FCCV e na F4,5.

5.4 Imobilização por ligação covalente de lipase da fibra tratada/funcionalizada

As tabelas 13 e 14 mostram as medidas de atividade, rendimento de imobilização e teor de proteína para a imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* (CALB) nos suportes FF e FLF.

Tabela 13. Parâmetros de imobilização de CALB em FF sob duas condições de pH (7 e 10) e tempo de contato (2 e 24h)

Parâmetros de imobilização	pH 7 e	pH=7 e	pH=10 e	pH=10 e
	t=2h	t=24h	t=2h	t=24h
Atividade no derivado(U/kg)	684±47	1039±95	185±29	154±72
Atividade recuperada (%)	<1	<1	1	<1
Rendimento de Imobilização (%)	23	38	5	27
Teor de proteína imobilizado (µg/g)	3	6	3	3
Atividade Específica (U/µg de proteína)	0,23	0,17	0,06	0,05

A representação <1 indicam as amostras que obtiveram atividade recuperada inferior a 1%
Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 14. Parâmetros de imobilização de CALB em FLF sob duas condições de pH (7 e 10) e tempo de contato (2 e 24h)

Parâmetros de imobilização	pH 7 e	pH=7 e	pH=10 e	pH=10 e
	t=2h	t=24h	t=2h	t=24h
Atividade no derivado (U/kg)	396±58	383±63	308±29	602±47
Atividade recuperada (%)	<1	<1	<1	<1
Rendimento de imobilização (%)	31	47	21	53
Teor de proteína imobilizado (µg/g)	3	1,5	7	6
Atividade Específica (U/µg de proteína)	0,13	0,26	0,04	0,10

A representação <1 indicam as amostras que obtiveram atividade recuperada inferior a 1%
Fonte: Elaborado pela autora

Com base nos resultados, o tempo e o pH da solução provocaram alterações no processo de imobilização de CALB em suportes funcionalizados com grupamento aldeído a base de fibra de coco verde. Observou-se que a condição de imobilização que promoveu maior atividade no derivado para a FF foi em pH 7 durante 24h com atividade medindo 1039 U/kg. Para o suporte FLF, maior atividade no derivado (602 U/kg) foi observado em pH 10, após 24h de contato enzima:suporte.

No suporte FF, a elevada atividade apresentada pela enzima imobilizada em pH 7 em relação a enzima imobilizada em pH 10, pode estar relacionado ao fato

de que em pH 10 os grupos amina das enzimas são mais reativos, desta forma tendem a se ligar a mais pontos do suporte, podendo provocar deformação na conformação da enzima (BLANCO *et al.*, 1989). Os valores iguais do teor de proteína imobilizada em pH 10 frente ao observado em 2h, pH 7, fortalecem essa hipótese. Além disso, a maior atividade e maior teor de proteína imobilizada também deu-se em maior tempo. Possivelmente isto tenha decorrido da baixa reatividade dos grupos amina em pH neutro, contribuindo para que as ligações demorem mais tempo para serem formadas (MATEO *et al.*, 2007).

Para o suporte FLF, a maior atividade apresentada foi em pH10, após 24h (601,9 U/kg). O teor de proteína imobilizado em pH 10 também foi maior frente ao obtido em pH 7. Como dito anteriormente, em pH 10 os grupamentos amina se tornam mais reativos pois neste pH eles encontra-se na forma de nucleófilos. Para esta condição, como a fibra foi apenas lavada com água, ela ainda possui uma quantidade moderada de ceras em sua superfície, sendo possível que tenha ocorrido também imobilização por adsorção devido à forte atração da CALB por suportes hidrofóbicos. No entanto, seriam necessárias mais análises para confirmar esta teoria.

Comparando os resultados de ambos os suportes, em pH 7, a remoção de ceras e outros extrativos no pré-tratamento da fibra de coco contribuiu para uma melhor interação suporte:enzima, resultando em um derivado mais ativo (pouco mais que 2,5 vezes o valor obtido em FLF). Visando um derivado ligado de forma multi-pontual ao suporte (imobilização em pH 10), o suporte obtido da fibra apenas lavada com água e posteriormente funcionalizado mostrou-se o mais adequado imobilizando maior teor de proteína e alcançando uma atividade quase 4 vezes maior que o derivado obtido em suporte de fibra pré-tratada (FF).

Brígida *et al.*(2007), também trabalharam com imobilização de CALB em fibra de coco funcionalizada e eles obtiveram valores de atividade de 42 U/g para a CALB imobilizada em pH 7 e 20 U/g para a imobilizada em pH 10. Desta forma, faz-se necessário testes e estudos mais aprofundados a respeito das técnicas de imobilização, visando o aumento da atividade no derivado.

6 CONCLUSÕES

Com a oxidação utilizando H_2O_2 com concentração de 4,5% em pH 11,5 foi possível remover as impurezas na superfície da fibra de coco verde, aumentando o teor de celulose e melhorando a estabilidade térmica das fibras. Foi possível realizar as funcionalizações com periodato de sódio e cloreto de p-toluenosulfonila. Obtendo para o periodato 198 μ mol de grupamentos aldeído por grama de fibra na FF e para para o cloreto de p-toluenosulfonila um teor de 22% também para a melhor condição. Foi possível realizar a funcionalização da fibra apenas lavada com água (FLF) nas mesmas condições reacionais em que a fibra pré-tratada foi testada, com ambos os agentes funcionalizantes. O reagente selecionado para auxiliar na funcionalização com cloreto de p-toluenosulfonila foi a TEA pois mostrou um impacto ambiental inferior ao da piridina. No entanto, estudos futuros serão necessários para melhorar as etapas relacionadas à reação da fibra com cloreto de p-toluenossulfonila. As fibras que passaram pelo teste de estabilidade mostraram que de acordo com as análises de cor e de TGA houve remoção de alguns componentes da fibra, no entanto o FTIR mostrou que a estrutura lignocelulósica dela foi preservada. As fibras pré-tratadas e posteriormente oxidadas com o periodato possuem maior estabilidade no meio reacional, pois foi a que mostrou menor tendência a contaminar o meio. O teste em tampão pH 5 foi o que causou um maior dano as fibras, dessa maneira entre os meios testados esse seria o menos recomendado. Foi possível imobilizar CALB tanto em pH7 quanto em pH10 nas fibras funcionalizadas com periodato (FF e FLF). Apesar de ambos suportes preparados se mostrarem capazes de imobilizar as enzimas, devido à diferença de composição de ambos se faz necessário aplicações distintas. Para a FF sugere-se aplicações onde o coproduto necessite ser mais limpo e para a FLF, sugere-se aplicações relacionadas ao tratamento de resíduos. Apesar da necessidade de maiores estudos sobre imobilização para avaliar as melhores condições de imobilização e estabilidade dos derivados obtidos, pode-se concluir que a funcionalização da fibra da casca de coco verde com periodato de sódio, sem o uso de outros agentes funcionalizantes, é um método bastante promissor. Esse método foi capaz de produzir suporte que se mostrou capaz de possuir elevada quantidade de grupos reativos, elevada resistência e boa estabilidade térmica.

7 TRABALHOS FUTUROS

Mesmo a fibra da casca de coco verde se mostrando muito promissora como suporte para imobilização de enzimas, o que também foi relatado em outros trabalhos, ainda existem temáticas a serem exploradas como:

- Estudar o efeito de condições de imobilização, variando pH, tempo, temperatura, proporção entre a enzima e o suporte;
- Testar o suporte produzido utilizando outras enzimas;
- Investigar mais detalhadamente a influência variação do tempo e da concentração do cloreto de p-toluenosulfonila na reação;
- Caracterizar o suporte produzido utilizando o cloreto de p-toluenosulfonila;
- Realizar a imobilização das enzimas no suporte preparado com cloreto de p-toluenosulfonila;
- Realizar os testes de estabilidade com o suporte preparado com o cloreto de p-toluenosulfonila;
- Verificar o potencial da reutilização de todos os suportes preparados.

REFERÊNCIAS

- ABHEMANYU, P. C. ; PRASSANTH, E.; KUMAR, T. N.;VIDHYASAGAR, R.; MARIMUTHU, K. P.; PRAMOD, R. Characterization of natural fiber reinforced polymer composites. **AIP Conference Proceedings**, v. 2080, 2019.
- AGUIEIRAS, E. C. G. ; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M.G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52–67, 2015.
- ALBAYRAK, N. ; YANG, S. T. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on tosylated cotton cloth. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 4, p. 371–383, 2002.
- AMARAL, P. F. F. ; ROCHA-LEÃO M. H. M.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P. ; COELHO, M. A. Z. Improving lipase production using a perfluorocarbon as oxygen carrier. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 1374,p. 1368–1374, 2006.
- ANDERSON, E. M. ; LARSSON, K. M.; KIRK, O. One biocatalyst - many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 16, n. 3, p. 181–204, 1998.
- ANWAR, Z. ; GULFRAZ, M. ; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy : A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 1–11, 2014.
- ATKINS, P. ; JONES, L. Princípios de Química. 5ª ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2012. 1026 p. v.22.
- BANERJEE, G. ; CAR, S. ; LIU, T. ; WILLIAMS, D. L. ; MEZA, S. L. ; WALTON, J. D. ; HODGE, D. B. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover : effects of biomass , peroxide , and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. **Biotechnonology and Bioengineering**, v.109, n.4, p. 1–15, 2012.
- BARBOSA, O. ; ORTIZ, C. ; BERENQUER-MURCIA, A. ; TORRES, R. ; RODRIGUES, R. C. ; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, n. 4, p. 1583–1600, 2014.
- BELLO, O. S. ; ADEGOKE K. A. ; FAGBENRO, S. O. ; LAMEED, O. S. Functionalized coconut husks for rhodamine-B dye sequestration. **Applied Water Science**, v. 1, p. 3, 2019.
- BEZERRA, T. M. S. ; BASSAN, J. C. ; SANTOS, V. T. O; MONTI, A. F. R. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. **Process Biochemistry**, v.50, n.3, p.417-423, 2014.
- BLANCO, R. M. ; CALVETE, J. J. ; GUISÁN, J. M. Immobilization-stabilization of enzymes ; variables that control the intensity of the trypsin (amine) -agarose (

aldehyde) multipoint attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 353–359, 1989.

BORGIO, J. F. Immobilization of Microbial (Wild and Mustant Strains) Amylase on Coconut Fiber and Alginate Matrix for Enhanced Activity. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 3, n. 1, p. 255–264, 2011.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRÍGIDA, A. I. S. ; PINHEIRO, A. D. T. ; FERREIRA, A. L. O. ; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by Adsorption to Green Coconut Fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 173–187, 2007.

BRÍGIDA, A. I. S. ; CALADO, V. M. A. ; GONÇALVES, L. R. B. ; COELHO, M. A. Z. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 832–838, 2010.

BRÍGIDA, A. I. S. ; PINHEIRO, A. D. T. ; FERREIRA, A. L. O. ; PINTO, G. A. S. ; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment to green coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 67–80, 2007.

CABRAL B. V. ; FALLEIROS, L. N. S. S. ; RIBEIRO, E. J. Estudo da imobilização de invertase em resinas de troca iônica e produção de açúcar invertido. **Horizonte Científico**, v. 6, n.2, p. 92-118, 2013.

CABRAL, M. M. S; ABUD, A. K. S. ; ROCHA, M. S. R. S. ; ALMEIDA, R. M. R. G. ; GOMES, M. A. Composição da fibra da casca de coco verde in natura e após pré-tratamentos químicos. **Engevista**, v. 19, n. 1, p. 99, 2017.

CAO, Y. ; CHEN, S. S. ; ZHANG, S. ; OK, Y. S. ; MATSAGAR, B. M. ; WU, K. C. ; TSANG, D. C. W. Advances in lignin valorization towards bio-based chemicals and fuels: Lignin biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 291, 2019.

CARDOSO, C. L ; MORAES, M. C. ; CASS, Q. B. Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: A tool to research of inhibitor compounds. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175–187, 2009.

CHAVES, L. S. ; NEVES, S. Fatores que Influenciam a Capacidade de Adsorção de Cobre (II) no Pó da Casca de Coco Verde. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 11, p. 155–169, 2019.

CHIBATA, I. Biocatalysis: immobilized cells and enzymes. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 37, p. 63–86, 1986.

CHOUDHURY, A. K. R. Introduction to Enzymes. 1st ed. Índia, Elsevier Ltd, 2018. 16 p. v.1.

COSTA-SILVA, T. A. ; COGNETTE, R. C. ; SOUZA, C. R. F. ; SAID, S. ; OLIVEIRA, W. P. Spouted Bed Drying as a Method for Enzyme Immobilization Spouted Bed Drying as a Method for Enzyme Immobilization. **Drying Technology: An International Journal** n. 31, p. 1756–1763, 2013.

CRISTÓVÃO, R. O. ; SILVÉRIO, S. C. ; TAVARES, A. P. M. ; BRÍGIDA, A. I. S. ; LOUREIRO, J. M. ; BOAVENTURA, R. A. R. ; MACEDO, E. A. ; COELHO, M. A. Z. Green coconut fiber : a novel carrier for the immobilization of commercial laccase by covalent attachment for textile dyes decolourization. **World journal of microbiology and biotechnology**. n.28, p. 2827–2838, 2012.

CRISTÓVÃO, R. O. ; SILVÉRIO, S. C. ; TAVARES, A. P. M. ; BRÍGIDA, A. I. S. ; LOUREIRO, J. M. ; BOAVENTURA, R. A. R. ; MACEDO, E. A. ; COELHO, M. A. Z. Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 6–12, 2011.

DALLA-VECCHIA, R. ; NASCIMENTO, M. G. ; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DEMUNER, B. J.; PEREIRA JUNIOR, N. ; ANTUNES, A. M. S. Technology prospecting on enzymes for the pulp and paper industry. **Journal of Technology Management and Innovation**, v. 6, n. 3, p. 148–158, 2011.

EIJSINK, V. G. H.; GASEIDNESS, S.; BORCHERT, T. V.; BURG, B. V. D. Directed evolution of enzyme stability. **Biomolecular Engineering**, v. 22, p. 21–30, 2005.

EL-SAYED, N. S.; EL-SAKHAWY, M.; BRUN, N.; HESEMAN, P. New approach for immobilization of 3-aminopropyltrimethoxysilane and TiO₂ nanoparticles into cellulose for BJ1 skin cells proliferation. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 193–204, 2018.

ELIAS, N.; CHANDREN, S.; RAZAK, F. I. A.; JAMALIS, J.; WIDODO, N.; WAHAB, R. A. Characterization, optimization and stability studies on *Candida rugosa* lipase supported on nanocellulose reinforced chitosan prepared from oil palm biomass. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 306–316, 2018.

EUROPEAN COMMISSION. ILCD Handbook: Framework and requirements for LCIA models and indicators. 1st ed., Luxembourg: Publication office of the European Commission, 2010. 60 p., v.1.

FARIAS, J. G. G. ; CAVALCANTE, R. C. ; CANABARRO, B. R. ; VIANA, H. M. ; SCHOLZ, S. ; SIMÃO, R. A. Surface lignin removal on coir fibers by plasma treatment for improved adhesion in thermoplastic starch composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 165, p. 429–436, 2017.

FATHI, B. ; HARIRFOROUSH, M. ; FORUZANMEHR, M. ; ELKOUN, S. ; ROBERT, M. Effect of TEMPO oxidation of flax fibers on the grafting efficiency of silane coupling agents. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 17, p. 10624–10636, 2017.

FORESTI, M. L. ; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by

lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. 107–108, p. 23–30, 2005.

GALBE, M. ; WALLBERG, O. Biotechnology for Biofuels Pretreatment for biorefineries : a review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials. **Biotechnology for Biofuels**, p. 1–26, 2019.

GONÇALVES, F. A. ; RUIZ, H. A. ; NOGUEIRA, C. C. ; SANTOS, E. S. ; TEIXEIRA, J. A. ; MACEDO, G. R. Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. **Fuel**, v. 131, p. 66–76, 2014.

GONZÁLEZ, I. ; OLIVER-ORTEGA, H. ; TARRÉS, Q. ; DELGADO-AGUILAR, M. ; MUTJÉ, P. ; ANDREU, D. Immobilization of antimicrobial peptides onto cellulose nanopaper. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 741–748, 2017.

GONZÁLEZ, M. E. ; CEA, M. ; REYES, D. ; ROMERO-HERMOSO, L. ; HIDALGO, P. ; MEIER, S. ; BENITO, N. ; NAVIA, R. Functionalization of biochar derived from lignocellulosic biomass using microwave technology for catalytic application in biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 137, p. 165-173, 2017.

GOULD, J. M. Studies on the Mechanism of Al ka I i ne Peroxide Delignification of Agricultural Residues. **Biotechnolgy and Bioengineering**, v. 27, p. 225–231, 1984.

GUIMARÃES, J. L. ; FROLINI, E. ; SILVA, C. G. ; WYPYCH, F. ; SATYANARAYANA, K. G. Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 3, p. 407–415, 2009.

GUISAN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 10, p. 375–382, 1988.

HABIBI, Y. ; LUCIA, L. A. ; ROJAS, O. J. Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3479-3500, 2002.

HAIDER, T. ; HUSAIN, Q. Hydrolysis of milk/whey lactose by β galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 1, p. 576–580, 2009.

HERMANSON, G. T. The Reactions of Bioconjugation. **Bioconjugate Techniques**, p. 229–258, 2013.

HERNANDEZ, K. ; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 2, p. 107–122, 2011.

ITTRAT, P. ; CHACHO, T. ; PHOLPRAYON, J. ; SUTTIWARAYANON, N. ; CHARONENPANICH, J. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Application of agriculture waste as a support for lipase immobilization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 77–82, 2014.

BRITO, M. J. P. ; VELOSO, C. M. ; BONOMO, R. C. F. ; FONTÁN, R. C. I. ; SANTOS, L. S. ; MONTEIRO, K. A. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization. **Fuel Processing Technology**, v. 156, p. 421-428, 2017.

KHAN, M. ; ALI, M. Effect of super plasticizer on the properties of medium strength concrete prepared with coconut fiber. **Construction and Building Materials**, v. 182, p. 703-715, 2018.

KIM, U. J. ; KUGA, S. ; WADA, M. ; OKANO, T. ; KONDO, T. Periodate Oxidation of Crystalline Cellulose. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 488-192, 2000.

KOZAN, J. V. B. ; SILVA, R. P. ; SERRANO, S. H. P. ; LIMA, A. W. O. ; ANGNES, L. Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing peroxidases naturally immobilized on coconut (*Cocos nucifera* L .) fibers. **Analytica Chimica Acta**, v. 591, p. 200–207, 2007.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2–3, p. 126–139, 2004.

KUMARI, S. ; CHAUHAN, G. S. ; AHN, J. H. ; REDDY, N. S. Bio-waste derived dialdehyde cellulose ethers as a supports for α -chymotrypsin immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 227-237, 2015.

LI, M. F. ; FAN, Y. M. ; XU, F. ; SUN, R. C. ; ZHANG, X. L. Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: Characterization of the cellulose rich fraction. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 551–559, 2010.

LIMA, A. W. O. ; NASCIMENTO, V. B. ; PEDROTTI, J. J. Coconut-based plant tissue reactor for biosensing of catechol in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 354, p. 325–331, 1997.

LIU, D. ; CHEN, J. ; SHI, Y. Trends in Analytical Chemistry Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332–342, 2018.

MANOEL, E. A. ; SANTOS, J. C. S. ; FREIRE, D. M. G. ; RUEDA, N. ; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53–57, 2015.

MATEO, C. ; PALOMO, J. M. ; FERNANDEZ-LORENTE, G. ; GUISAN, J. M. ; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p.

1451–1463, 2007.

MATTOS, A. L. A. ; ROSA, M. F. ; CRISÓSTOMO, L. A. ; BEZERRA, F. C. ; CORREIA, D. ; VERAS, L. G. C. Beneficiamento da casca de coco verde. **Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza**, p. 37, 2011.

MENDES, A. A. ; CASTRO, H. F. Aplicação de lipases em águas residuárias com elevados teores de lipídeos, **Química nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MEYER, A. S. Enzyme technology for precision functional food ingredient processes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1190, p. 126–132, 2010.

MOHAMAD, N. R. ; MARZUKI, N. H. C. ; BUANG, N. A. ; HUYOP, F. ; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

MORÁN, J. I. ; ALVARES, V. A. ; CYRAS, V. P. ; VÁZQUEZ, A. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. **Cellulose**, v. 15, n. 1, p. 149–159, 2008.

NASCIMENTO, D. M. ; ALMEIDA, J. S. ; DIAS, A. F. ; FIGUEIRÊDO, M. C. B. ; MORAIS, J. P. S. ; FEITOSA, J. P. A. ; ROSA, M. F. A novel green approach for the preparation of cellulose nanowhiskers from white coir. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 456–463, 2014.

NASCIMENTO, D. M. ; ALMEIDA, J. S. ; VALE, M. S. ; LEITÃO, R. C. ; MUNIZ, C. R. ; FIGUEIREDO, M. C. B. ; MORAIS, J. P. S. ; ROSA, M. F. A comprehensive approach for obtaining cellulose nanocrystal from coconut fiber. Part I: Proposition of technological pathways. **Industrial Crops and Products**, v. 93, p. 66–75, 2016.

NIKOLIC, T. ; KOSTIC, M. ; PRASKALO, J. ; PEJIC, B. ; PETRONIJEVIC, Z. ; SKUNDRIC, B. Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 976–981, 2010.

NILSSON, K. ; MOSBACH, K. Immobilization of Ligands with Organic Sulfonyl Chlorides. **Methods in Enzymology**, v. 104, p. 56–69, 1984.

OKINO-DELGADO, C. H. ; PRADO, D. Z. ; FACANALI, R. ; MARQUES, M. M. O. ; NASCIMENTO, A. S. ; FERNANDES, C. J. C. ; ZAMBUZZI, W. F. ; FLEURI, L. F. Bioremediation of cooking oil waste using lipases from wastes. **Plos One**, p. 1–17, 2017.

RABELO, S. C. ; MACIEL FILHO, R. ; COSTA, A. C. A Comparison Between Lime and Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatments of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 144, p. 87–100, 2008.

TRAN, D. N. ; BALKUS, K. J. Perspective of Recent Progress in Immobilization Enzymes, **ACS Catalisys**, v. 1, p. 956–968, 2011.

RAHMAN, N. S. A. ; AHMAD, N. A. ; YHAIA, M. F. ; AZAHARI, B. ; ISMAIL, W. R. Crosslinking of fibers via azide-alkyne click chemistry: Synthesis and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 25, p. 1–8, 2016.

ROBERT, J. ; MANOEL, E. A. ; PINTO, M. C. C. ; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. ; PINTO, J. C. ; BARRANCO, F. V. ; FREIRE, D. M. G. Production , immobilization and synthesis of pharmacological derivatives of lipase B from *Candida antarctica* in *Pichia pastoris*. **ECI Digital Archives**, p. 4–6, 2018.

RODRIGUES, C. ; CASSINI, S. T. ; ANTUNES, P. W. ; KELLER, R. P. ; GONÇALVES,, R. F. Isolation and selection of lipase-producing fungi based on lipase activity and hydrolytic potential on soybean oil and grease trap scum. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 507–518, 2016.

RODRIGUES, R. C. ; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 1–2, p. 1–22, 2010.

ROSA, M. F. ; MEDEIROS, E. S. ; MALMONGE, J. A. ; GREGORSKI, K. S. ; WOOD, D. S. ; MATTOSO, L. H. C. ; GLENN, G. ; ORTS, W. J. ; IMAM, S. H. Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: Effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 1, p. 83–92, 2010.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 14, p. 841-845, 2008.

SAMANTA, S. ; JANA, M. ; MAITY, C. ; KAR, S. ; MOHAPATRA, P. K. ; PATI, B. R. ; MONDAL, K. C. The potential of immobilized bacterial α -amylase on coconut coir , a smart carrier for biocatalysts. **Biocatalisys and Biotransformation**, v. 27, n. 2, p. 131-135, 2009.

SANCHEZ, S. ; DEMAIN, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Organic Process Research and Development**, v. 15, n. 1, p. 224–230, 2011.

SHELLER, H. V. ; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263–289, 2010.

SCHWEIGER, R. G. Polysaccharide sulfates. I. cellulose sulfate with a high degree of substitution. **Carbohydrate Research**, v. 21, n. 2, p. 219–228, 1972.

SILVA, A. S. ; TEIXEIRA, R. S. S. ; MOUTTA, R. O. ; FERREIRA-LEITÃO, V. S. ; BARROS, R. R. O. ; FERRARA, M. A. ; BOM, E. P. S. Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production. 1st ed., Croácia: Intechopen, 2013. 276 p., v.1.

SOCRATES, G. *Infrared and Raman characteristic group frequencies*. 3rd ed. Londres: Journals of Raman Spectroscopy, 2001. 347 p., v.1.

SOUZA, N. F. ; PINHEIRO, J. A. ; BRÍGIDA, A. I. S. ; MORAIS, J. P. S. ; SOUZA FILHO, M. S. M.; ROSA, M. F. Fibrous residues of palm oil as a source of green

chemical building blocks. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 480–489, 2016.

SOUZA, T. C. ; FONSECA, T. S. ; COSTA, J. A. ; ROCHA, M. V. P.; MATTOS, M. C. ; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. ; GONÇALVES, L. R. B. ; SANTOS, J. C. S. Cashew apple bagasse as a support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*: Application to the chemoenzymatic production of (R)-Indanol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 130, p. 58–69, 2016.

STAUCH, B. ; FISHER, S. F. ; CIANCI, M. Open and closed states of *Candida antarctica* Lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 12, p. 1–34, 2015.

STELTE, W. ; BARSBERG, S. T. ; CLEMONS, C. ; MORAIS, J. P. S. ; ROSA, M. F. ; SANADI, A. R. Coir Fibers as Valuable Raw Material for Biofuel Pellet Production. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 11, p. 3535–3543, 2018.

SUDALAI, A. ; KHENKIN, A. ; NEUMANN, R. Sodium periodate mediated oxidative transformations in organic synthesis. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 15, p. 4374–4394, 2015.

SUN, W. ; OTHMAN, M. Z. A selective fractionation method of lignocellulosic materials using electro-assisted organosolv pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 288, 2019.

TAHERZADEH, M. J. ; KARIMI, K. Acid-basis hydrolysis for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, n. 3, 2007.

TAPPI. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. Technical Association of the Pulp and Paper Industry. T222 om-02. **Bioresource Technology**, v. 3, p. 1–7, 2002.

TARDIOLI, P. W. ; PEDROCHE, J. ; GIORDANO, R. L. C. ; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. ; GUISÁN, J. M. Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 352–360, 2003.

TELI, M. D. ; VALIA, S. P. ; MIFTA, J. Application of functionalized coir fibre as eco-friendly oil sorbent. **Journal of the Textile Institute**, v. 108, n. 7, p. 1106–1111, 2017.

UNION, I. ; PURE, O. F. ; CHEMISTRY, A. Classification and Chemical Characteristics of Immobilized Enzymes, **Pure and applied Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 597–600, 1995.

VASCONCELOS, N. F. ; ANDRADE, F. K. ; VIEIRA, L. A. P. ; VIEIRA, R. S. ; VAZ, J. M. ; CHEVALLIER, P. ; MANTOVANI, D. ; BORGES, M. F. ; ROSA, M. F. Oxidized bacterial cellulose membrane as support for enzyme immobilization : properties and morphological features. **Cellulose**, v. 27, p. 3055-3083, 2020.

VIGYÁZÓ, L. V. ; HAARD, N. F. Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 49–127, 1981.

VILLENEUVE, P. ; MUDERHWA, J. M. ; GRAILLE, J. ; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological

approaches. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 9, n. 4–6, p. 113–148, 2000.

WANG, X. ; QIN, X. ; LI, D. ; YANG, B. ; WANG, Y. One-step synthesis of high-yield biodiesel from waste cooking oils by a novel and highly methanol-tolerant immobilized lipase. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 18–24, 2017.

WIDIYASTUTI, M. ; FAUZIYAH, M. ; BALGIS, R. ; SETYAWAN, H. Production of cellulose aerogels from coir fibers via an alkali-urea method for sorption applications. **Cellulose**, v. 26, p.9583-9598, 2019.

WILLIAM, A. O. ; BORA, P. S. Application of a new continuous flow spectrophotometric method for the characterization of polyphenol oxidase naturally immobilized on coconut fiber. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, p. 237–254, 2002.

YOO, C. G. ; MENG, X. ; PU, Y. ; RAGAUSKAS, A. J. The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: a comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 1-37, 2020.

ZHANG, H. ; LIU, T. ; ZHU, Y. ; HONG, L. ; LI, T. ; WANG, X. ; FU, Y. Lipases immobilized on the modified polyporous magnetic cellulose support as an efficient and recyclable catalyst for biodiesel production from *Yellow horn* seed oil. **Renewable Energy**, v. 145, p. 1246–1254, 2020.